

Klinik und Pathologie von Scrapie im Mausmodell bei unterschiedlichen Inokulationsrouten

SIMONE BALLKE

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
dem Institut für Immunologie
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Tübingen
Betreuer: Prof. Dr. Lothar Stitz

Klinik und Pathologie von Scrapie im Mausmodell bei unterschiedlichen Inokulationsrouten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Simone Ballke

Tierärztin aus Mainz

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Lothar Stitz

Prof. Dr. Tillmann Rümenapf

Tag der Disputation: 09.03.2012

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Simone Ballke

Diese Arbeit wurde zum Teil finanziert durch das TSE-Programm Baden-Württemberg,
Bewilligung 729.59-7 / 1 und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG),
Bewilligung STI / 4-2.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hanns-Joachim Rziha für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung und Unterstützung zu jeder Zeit der Arbeit und die passende „Dosierung“ zwischen wissenschaftlicher Anleitung und wissenschaftlichen Freiheiten, die die gesamte Arbeitsgruppe zu etwas Besonderem gemacht hat.

Herrn Prof. Dr. Lothar Stitz danke ich besonders für die Durchsicht und Begutachtung der Arbeit sowie für die Betreuung und das Interesse an der Arbeit und das insgesamt gute Arbeitsklima im gesamten Institut.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Aguzzi und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der tga20-Mäuse und des Antikörpers POM1 sowie für die Hilfestellung und gute Zusammenarbeit. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Groschup und seine Arbeitsgruppe, vor allem an Chris, für die Hilfestellung und die Durchsicht der ersten Proben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat: Karin, die mir eine unglaubliche Hilfe war bei der Bearbeitung der unzähligen Proben; Bertel, die den Durchblick bei allen Laborfragen hatte; Karina, für ihre sagenhafte Geduld beim Schneiden; Britta, für die Einführung im „Maus-Handling“ und ihre Diskussionsbereitschaft; Patrik, für seine Hilfe bei biochemischen Fragen und seinen Humor.

Bei Elli und Silke bedanke ich mich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei allen Fragen zu Mäusen und Western Blots. Ein großes Danke auch an Soizic und Benni für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Fragen. Und bei Eva bedanke ich mich für ihre freundschaftliche Kollegialität und unglaublich viel Spaß im Laboralltag.

Bei den Tierpflegern des FLI bedanke ich mich sehr für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Betreuung der Mäuse. Ferner bedanke ich mich sehr bei Herrn Kramer, der mir bei allen fotografischen Arbeiten eine große Hilfe war.

Bei meinem gesamten Freundeskreis bedanke ich mich ganz besonders für ein immer offenes Ohr, viel Geduld und sehr viel Kaffee.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: Bei meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich bei meinen Zielen geduldig und uneingeschränkt unterstützt haben. Bei meinen Eltern und Schwiegereltern für die liebevolle Betreuung von Mathilda. Und bei meinem Mann Christian, der so viel Geduld und Verständnis aufbringen musste und mich immer wieder ermutigt hat. Und bei meiner Tochter Mathilda, die während der letzten Wochen so unglaublich brav und fröhlich war.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Der Erreger.....	4
2.2	Das zelluläre Prion-Protein (PrPc).....	10
2.3	Speziesbarriere und Übertragung	11
2.4	Neuropathologie.....	13
2.5	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren	14
2.5.1	Scrapie	14
2.5.2	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE).....	17
2.5.3	Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME).....	21
2.5.4	Chronisch Zehrende Krankheit (Chronic Wasting Disease, CWD).....	21
2.5.5	Weitere TSE bei Tieren	22
2.6	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Menschen	23
2.6.1	Kuru.....	23
2.6.2	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt Jakob Disease, CJD)	25
2.6.2.1	Klassische CJD	25
2.6.2.2	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (variant Creutzfeldt Jakob Disease, vCJD).....	26
2.6.3	Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS)	28
2.6.4	Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Material	29
3.1.1	Puffer und Lösungen	29
3.1.1.1	Puffer und Lösungen für die Histologie/Immunhistochemie	29
3.1.1.2	Puffer und Lösungen für proteinanalytische Methoden	30
3.1.1.3	Puffer und Lösungen für RNA/DNA	32
3.1.2	Antikörper	34

3.1.3 Marker	34
3.1.4 Enzyme.....	34
3.1.5 Kits	35
3.1.6 Chemikalien	35
3.1.7 Geräte und Laborhilfsmittel	37
3.2 Methoden	40
3.2.1 Versuchstiere	40
3.2.2 Herstellung des Gehirnhomogenates und Berechnung des Infektiositätstiters	40
3.2.3 Inokulation	40
3.2.4 Klinische Überwachung	41
3.2.5 Probenentnahme	41
3.2.6 Histologie und Immunhistochemie	43
3.2.6.1 Einbettung.....	43
3.2.6.2 Anfertigen von histologischen Schnitten.....	43
3.2.6.3 Deparaffinisierung.....	43
3.2.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	44
3.2.6.5 Immunhistochemie	44
3.2.6.5.1 Nachweis des Glial Acidic Fibrillary Protein (GFAP).....	44
3.2.6.5.2 Nachweis von PrPsc	45
3.2.6.6 Entwässerung und Eindecken.....	46
3.2.6.7 Beurteilung der Vakuolisierung	46
3.2.6.8 Beurteilung der Astrozytose	48
3.2.6.9 Beurteilung der PrPsc-Ablagerungen	48
3.2.7 Proteinbiochemische Methoden	49
3.2.7.1 Herstellung der Homogenate.....	49
3.2.7.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	50
3.2.7.3 Proteinase K-Behandlung.....	50
3.2.7.4 Natriumphosphorwolframsäure (NaPTA)-Fällung	51
3.2.7.5 SDS-PAGE.....	51
3.2.7.6 Western Blot Analyse.....	52
3.2.8 Expressionsanalysen.....	52
3.2.8.1 Isolierung der RNA aus Gehirngewebe.....	52
3.2.8.2 RNA-Agarosegelelektrophorese.....	53

3.2.8.3	Northern-Transfer	53
3.2.8.4	Hybridisierung	54
3.2.8.5	Autoradiographie	54
3.2.8.6	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	55
3.2.8.7	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte	55
3.2.8.8	Densitometrie	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Klinische Beurteilung der Mäuse.....	57
4.1.1	Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)	57
4.1.1.1	Krankheitsverlauf	57
4.1.1.2	Klinische Symptome	58
4.1.2	Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation).....	60
4.1.2.1	Krankheitsverlauf	60
4.1.2.2	Klinische Symptome	61
4.1.3	Orale Inokulation.....	63
4.1.3.1	Krankheitsverlauf	63
4.1.3.1.1	Orale Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat	63
4.1.3.1.2	Orale Inokulation mit 10%igem Gehirnhomogenat	64
4.1.3.2	Klinische Symptome	65
4.1.4	Zusammenfassung	67
4.2	Beurteilung der Vakuolisierung	68
4.2.1	Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)	69
4.2.2	Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation).....	72
4.2.3	Orale Inokulation.....	76
4.2.4	Zusammenfassung	79
4.3	Beurteilung der Astrozytose.....	81
4.3.1	Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)	82
4.3.1.1	Immunhistochemie (IHC).....	82
4.3.1.2	RT-PCR	85
4.3.1.3	Northern Blothybridisierung	90
4.3.2	Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation).....	93
4.3.2.1	Immunhistochemie (IHC).....	93

4.3.2.2	RT-PCR	96
4.3.2.3	Northern Blothybridisierung	98
4.3.3	Orale Inokulation.....	101
4.3.3.1	Immunhistochemie (IHC).....	101
4.3.3.2	RT-PCR	104
4.3.3.3	Northern-Blothybridisierung	106
4.3.4	Zusammenfassung	108
4.4	Nachweis von PrPsc.....	110
4.4.1	Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)	112
4.4.1.1	PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC).....	112
4.4.1.2	Western Blot	117
4.4.2	Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation).....	119
4.4.2.1	PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC).....	119
4.4.2.2	Western Blot	123
4.4.3	Orale Inokulation.....	126
4.4.3.1	PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC).....	126
4.4.3.2	Western Blot.....	128
4.4.4	Zusammenfassung	130
5	Diskussion.....	131
5.1	Klinischer Verlauf.....	131
5.1.1	Inkubationszeiten	131
5.1.2	Symptome.....	133
5.2	Vakuolisierung	136
5.3	Astrozytose.....	138
5.4	PrPsc.....	140
6	Zusammenfassung	145
7	Summary	147
8	Literaturverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A. bidest.	doppelt destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
BSE	Bromphenolblau / Sucrose / EDTA
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Cb	Cerebellum
Ce	Cerebrum
CJD	Creutzfeldt Jakob Disease, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Cs	Corpus striatum
CWD	Chronic Wasting Disease, Chronisch zehrende Krankheit
Cx	Cortex
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Di	Dienzephalon
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dpi	days post infectionem, Tage nach Infektion
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektrophoresepuffer
EU	Europäische Union
FALD	RNA-Probenpuffer
FDC	Follikuläre Dendritische Zellen
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Acidic Fibrillary Protein

GSS	Gerstmann-Sträussler-Syndrom
h	Stunde
Hc	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
Hs	Hirnstamm
HTh	Hypothalamus
ic	intrazerebral
IHC	Immunhistochemie
ip	intraperitoneal
K	Kontrollen
kDA	kiloDalton
L	Liter
LRS	Lymphoretikuläres System
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonicacid
Mw	Mittelwert
n.a.	nicht auswertbar
NaPTA	Natriumphosphorwolframsäure
Nr.	Nummer
OIE	Office International des Epizooties
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinase K
PLP	Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd
PrP	Prion-Protein
PrPc	zelluläres Prion-Protein
PrPsc	Scrapie-assoziiertes Prion-Protein
PVDF	Polyvinylpyrrolidon
RML	Rocky Mountain Laboratory

Abkürzungsverzeichnis

RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SA	Streptavidin
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
sCJD	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SSC	Standard Saline Citrat
T	Tier
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / NaAcetat / EDTA
TBS	tris buffered saline, trisgepufferte Salzlösung
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N'-N' Tetramethylethylendiamin
Th	Thalamus
TME	Transmissible Mink Encephalopathy, Transmissible Enzephalopathie der Nerze
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRS	Target Retrieval Solution
TSA	Tyramide Signal Amplification
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
U	Enzymeinheit (Unit)
UV	ultraviolet
V	Volt
vCJD	variant Creutzfeldt Jakob Disease, neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zw	Zeitwert

1 Einleitung

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl bei Tieren als auch beim Menschen vorkommen. Die wichtigsten und bekanntesten TSE der Tiere sind Scrapie bei Schafen, Ziegen und Moufflons, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie der Rinder (BSE), die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (Chronic Wasting Disease, CWD) sowie die Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME). Beim Menschen sind vor allem Kuru, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt Jakob Disease, CJD) sowie das Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) von Bedeutung.

Scrapie ist seit über 200 Jahren als eine tödlich verlaufende Erkrankung bei Schafen bekannt. Bisher konnte keine epidemiologische Verbindung der Krankheit zum Menschen hergestellt werden. Mit dem Auftreten der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie im Jahr 1985 in Großbritannien (Wells *et al.* 1987) und dem gleichzeitigen Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen (vCJD) (Will *et al.* 1996) bekamen die TSE erstmals einen zoonotischen Charakter und rückten damit in das öffentliche und wissenschaftliche Interesse vor.

Nachdem BSE als eine TSE mit zoonotischem Charakter eingestuft worden war, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen und zahlreiche Überwachungsprogramme eingeleitet. Man geht davon aus, dass die Verfütterung kontaminierter Tiermehle an Rinder zur Entstehung von BSE führte (Nathanson *et al.* 1997; Wilesmith *et al.* 1992). So wurde beispielsweise ein EU-weites Verfütterungsverbot von Tiermehlen an lebensmittelliefernde Tiere und die Kennzeichnung und getrennte Entsorgung von spezifiziertem Risikomaterial bei Rindern, Schafen und Ziegen beschlossen. Die Einführung internationaler Überwachungsprogramme scheint wirksam zu sein. Nach einem Maximum von BSE-Fällen in den Jahren 1992/1993 in Großbritannien und 2001/2002 in Deutschland sinken die Zahlen weltweit kontinuierlich ab. Auch das befürchtete pandemische Auftreten von vCJD ist bisher ausgeblieben, weshalb Prionen-Erkrankungen aus dem öffentlichen Interesse wieder etwas verdrängt wurden.

Nach der „protein only“-Hypothese von Stanley B. Prusiner (Prusiner 1982) handelt es sich bei dem Erreger der TSE um die fehlgefaltete Isoform des zellulären Prion-Proteins (PrP^c), die als PrP^{sc} (PrP^{sc}) bzw. PrP^{res} (PrP^{res}) bezeichnet wird. Dieser unkonventionelle Erreger wurde in den letzten zwei Jahrzehnten intensiv untersucht. Doch noch immer ist die genaue Pathogenese der TSE nicht bekannt. Vor allem die epidemiologischen Aspekte, die genauen Übertragungswege sowie der Prionen-Tropismus sind noch nicht

abschließend geklärt (Aguzzi *et al.* 2008). Auch die physiologische Funktion des PrPc ist noch immer nicht bekannt. Neuropathologisch ist die sogenannte „Trias“ charakteristisch für TSE. Neben der Ausbildung von Vakuolen zeigen sich eine astrozytäre Gliose sowie PrPsc-Ablagerungen im Zentralen Nervensystem (ZNS).

In jüngster Zeit sind weitere, drängende Probleme aufgetreten. In vier Fällen wurde eine Übertragung von vCJD durch Bluttransfusion beschrieben (Llewelyn *et al.* 2004, Peden *et al.* 2004, Wroe *et al.* 2006). Zudem meldeten die Vereinigten Staaten einen rätselhaften Anstieg von Chronic Wasting Disease (Sigurdson 2008) sowie die ersten BSE-Fälle (Richt and Hall 2008). Zusätzlich scheint es in europäischen Schafherden zu einem erneuten Auftreten von Scrapie zu kommen, wie zum Beispiel in Schweden, Österreich und auf Sardinien (Aguzzi *et al.* 2008). Diese Befunde hängen möglicherweise auch mit den verbesserten und ausgedehnten Überwachungsprogrammen zusammen.

In jedem Fall sind weitere, umfassende Untersuchungen nötig, um TSE bei Menschen und Tieren besser verstehen zu können. Bisher stehen Zellkultur-Modelle nur für experimentell adaptierte Prionen-Stämme zur Verfügung, nicht aber für die Infektion mit Prionen von ursprünglichen Wirtsspezies, wie z.B. Rind, Schaf, Ziege oder Mensch (Groschup and Buschmann 2008). *In vivo* Modelle sind daher unerlässlich. Das Mausmodell und die Entwicklung transgener Mäuse, die beispielsweise heterologes PrPc oder definierte Mutanten des PrPc exprimieren, bieten gute Möglichkeiten, um die Pathogenese der TSE zu untersuchen (Groschup and Buschmann 2008).

Die in dieser Studie verwendeten transgenen tga20-Mäuse überexprimieren das zelluläre Prion-Protein (PrPc) im Gehirn im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009). Bekanntermaßen sind daher die Inkubationszeiten dieser Mäuse nach intrazerebraler Inokulation mit dem maus-adaptierten Rocky Mountain Laboratory (RML) Prionen-Stamm wesentlich kürzer als bei Wildtyp-Mäusen (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2002). Auch nach Inokulation mit dem maus-adaptierten Scrapie-Stamm ME7 oder auch mit CWD-Prionen werden tga20-Mäuse schneller krank als Wildtyp-Mäuse (Sigurdson *et al.* 2006, Thackray *et al.* 2002). Überraschenderweise ist bei tga20-Mäusen im späten Stadium von Scrapie weniger PrPsc nachweisbar als bei Tieren von Wildtyp-Mausstämmen im vergleichbaren Krankheitsstadium (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009). Eigene Vorversuche haben gezeigt, dass dies auch mit einer geringeren Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen einher geht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede bezüglich der Vakuolisierung, der reaktiven Gliose und der PrPsc-Akkumulation zwischen tga20-Mäusen und Wildtyp-Mäusen unter Einbeziehung verschiedener Inokulationswege erstmals genauer zu charakterisieren und mögliche Zusammenhänge zwischen klinischer Krankheit und neuropathologischen Veränderungen darzustellen. Es wurden daher transgene tga20-Mäuse sowie Tiere von zwei Wildtyp-Mausstämmen (CD-1 und C57/Bl6) sowohl intrazerebral (ic) als auch intraperitoneal (ip) und oral mit dem maus-adaptierten Prionen-Stamm RML inokuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion untersucht. Neben klinischem Verlauf und Scrapie-typischen Symptomen wurde die Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen und einer Astrozytose sowie die Akkumulation von PrPsc beurteilt. Hierzu wurden verschiedene Nachweismethoden miteinander verglichen. Der Nachweis der astrozytären Gliose erfolgte mittels Immunhistochemie (IHC) sowie mittels RT-PCR und Northern Blot Analyse. Die Untersuchung von PrPsc-Ablagerungen wurde immunhistochemisch sowie proteinbiochemisch durch Western Blot Analyse durchgeführt.

Es zeigte sich, dass tga20-Mäuse über den gesamten Beobachtungszeitraum und nach allen drei Inokulationswegen eine geringere Vakuolisierung, Astrozytenaktivierung und PrPsc-Akkumulation im Gehirn aufwiesen als die beiden untersuchten Wildtyp-Mausstämme in vergleichbaren Krankheitsstadien, bei denen bereits präklinisch, also bei klinisch unauffälligen Tieren, alle drei neuropathologischen Parameter in deutlichem Ausmaß und häufig stärker ausgeprägt waren als bei klinisch kranken tga20-Mäusen. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, die nach allen drei Inokulationsrouten vergleichbare Symptome innerhalb eines Mausstammes ausbildeten, zeigten tga20-Mäuse abhängig vom Inokulationsweg ein unterschiedliches klinisches Bild.

2 Literaturübersicht

Aufgrund ihrer Infektiosität sind Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) eine besondere Art der neurodegenerativen Erkrankungen. Sie können über Speziesbarrieren hinaus übertragbar sein und genetisch oder sporadisch auftreten.

Allen Formen gemeinsam ist eine spongiforme Vakuolisierung, die Ausbildung einer astrozytären Gliose sowie der Nachweis einer pathologischen Isoform des zellulären Prion-Proteins im Zentralen Nervensystem (ZNS). Ein weiteres gemeinsames Merkmal dieser Erkrankungen sind lange Inkubationszeiten.

2.1 Der Erreger

Anfang 1980 wies Prusiner in seinen Untersuchungen ein Protein als infektiöses Agens in Scrapie-infizierten Gehirnen nach (Prusiner 1982). Sämtliche Versuche, Nukleinsäure des Erregers nachzuweisen bzw. Infektiosität durch Methoden zur Inaktivierung von Nukleinsäuren zu reduzieren, waren fehlgeschlagen (Alper *et al.* 1967; Latarjet *et al.* 1970). Diese Eigenschaften des Agens führten zu der Annahme, dass es sich nicht um einen „klassischen Infektionserreger“, sondern um ein Protein handelte. 1982 stellte Prusiner die „protein only“-Hypothese auf (Prusiner 1982) und griff damit eine bereits in den 1960er Jahren publizierte Idee wieder auf, nach der ein Protein einen Infektionserreger darstellen könnte (Griffith 1967). Prusiner bezeichnete das Protein als „prion“ („proteinaceous infectious particle“), dessen pathologische Form (PrP^{sc}, „sc“ für Scrapie) durch Konformationsänderungen des zellulären Prion-Proteins (PrP^c) entsteht.

Mehrere Versuche diese These zu widerlegen sind fehlgeschlagen. Es ist bisher nicht gelungen die Scrapie-Infektiosität von dem Prion-Protein zu trennen bzw. Nukleinsäure nachzuweisen (Prusiner 1998). In Prion-Aufbereitungen, die eine hohe Scrapie-Infektiosität aufwiesen, konnten lediglich Oligonukleotide von weniger als 50 Basenpaaren gefunden werden (Kellings *et al.* 1994), die als Degradations-Produkte, entstanden bei der Aufreinigung der Prionen, angesehen werden. Dennoch vermuteten andere Arbeitsgruppen, dass es sich um ein unkonventionelles Virus handeln könnte (Merz *et al.* 1984; Rohwer 1984). Manuelidis und Mitarbeiter wiesen intrazelluläre, 25-nm große virus-ähnliche Partikel in infektiösen Gehirnantteilen und in infizierten Zellen *in situ* nach, die nicht durch Antikörper gegen PrP gebunden wurden und auch nicht Teil des pathologischen PrP-Amyloids waren. Die Autoren sehen darin eine klare und stichhaltige Alternative zur „protein only“-Hypothese (Manuelidis 2004; Manuelidis *et al.* 2007).

Nach der „protein-only“-Hypothese besteht die „Replikation“ der pathologischen Isoform in der PrPsc-vermittelten autokatalytischen Umfaltung von PrPc zu PrPsc (Prusiner 1989). Dabei ist die Aminosäuresequenz beider Proteine identisch (Oesch *et al.* 1985). Bisher gibt es zwei Modelle zur Erklärung dieser Umfaltung:

Im Heterodimerisations-Modell („refolding“ model) lagern sich jeweils ein PrPsc- und ein PrPc-Molekül aneinander und bilden zunächst ein Heterodimer. Das PrPc-Molekül nimmt ebenfalls die abnorme Konformation des PrPsc an und es bildet sich ein Homodimer, woraus zwei Moleküle PrPsc hervorgehen. Vermutet wird die Beteiligung eines weiteren Faktors, möglicherweise eines Enzyms oder Chaperons, das als „Protein X“ bezeichnet wird. Dieses Protein X bindet an das zelluläre Prion-Protein, so dass eine Zwischenform von PrPc entsteht, das sogenannte PrP*, das zugänglich ist für PrPsc (Perrier *et al.* 2000; Telling *et al.* 1995). Eine hohe Energie-Barriere verhindert dabei die spontane Umfaltung von PrPc zu PrPsc. Das Modell schlägt fünf Stellen vor, an denen die PrPsc-Akkumulation möglicherweise gestoppt werden kann (Abb. 1).

Bei der Kristallisationskeim-Hypothese („seeding“ model) geht man davon aus, dass PrPc und PrPsc in einem Gleichgewicht vorkommen, das stark zugunsten des PrPc vorliegt. Wenn sich mehrere PrPsc-Moleküle über einen längeren Zeitraum langsam zu einem Keim anordnen, in dem PrPsc stabil ist und nicht mehr zu PrPc zurückgefaltet werden kann, können weitere PrPsc-Moleküle angelagert werden und relativ schnell zu einem Amyloid aggregieren. Die Aggregate zerfallen in „infektiöse Kristallisationskeime“, die wiederum PrPsc-Moleküle anlagern können und die PrPsc-„Replikation“ aufrecht erhalten (Weissmann *et al.* 2002) (Abb. 2).

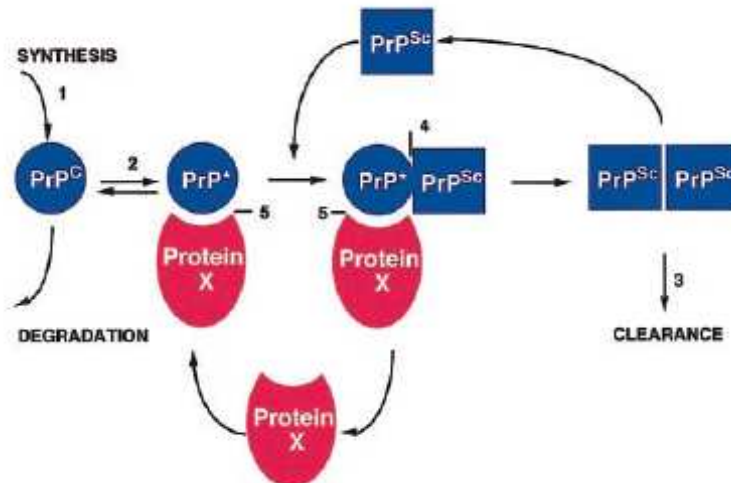


Abbildung 1: Heterodimerisations-Modell mit Beteiligung eines Protein X.

Fünf mögliche Ansatzpunkte, um eine PrP^{Sc}-Akkumulation zu verhindern: 1. PrP^C Synthese 2. Stabilisierung von PrP^C. 3. verstärkte PrP^{Sc} Beseitigung. 4. Bindung von PrP^C zu PrP^{Sc}. 5. Bindung von PrP^C an das Protein X (Perrier et al. 2000).

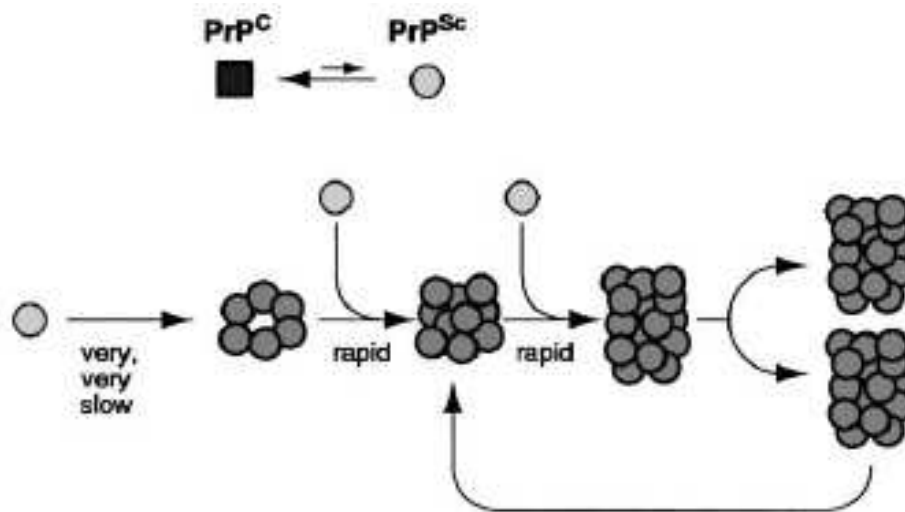


Abbildung 2: Kristallisationskeim-Hypothese: Das Gleichgewicht von PrP^C und PrP^{Sc} liegt zugunsten des PrP^C vor. Mehrere PrP^{Sc}-Moleküle ordnen sich zu stabilen Aggregaten an, in denen PrP^{Sc} nicht zurückgefaltet werden kann und zerfallen zu „infektiösen Kristallisationskeimen“ (Weissmann et al. 2002).

Wie oben beschrieben stellt PrP^{Sc} die pathologische Isoform des zellulären Prion-Proteins dar. Es hat zwar die gleiche Aminosäuresequenz wie PrP^C, besitzt jedoch einen größeren Anteil an β -Faltblatt-Strukturen (Pan *et al.* 1993) (Abb. 3). Im Gegensatz zu PrP^C bildet es unlösliche Aggregate und ist teilweise resistent gegenüber Verdau mit Proteinase K. Proteinase K spaltet N-terminal im Bereich von Aminosäure 90, so dass ein Protein von 27-30 kDa (PrP²⁷⁻³⁰) entsteht, das als infektiöses Agens angesehen wird (Bolton *et al.* 1982; Prusiner *et al.* 1982) und das Protease-resistente Kernstück des umgefalteten Prion-Proteins ist (Prusiner *et al.* 1984). Wie auch PrP^C kann PrP^{Sc} unglykosyliert, mono- und diglykosyliert vorliegen. Meistens liegt eine Mischung aller drei Formen in der Zelle vor (Zanusso *et al.* 2002).

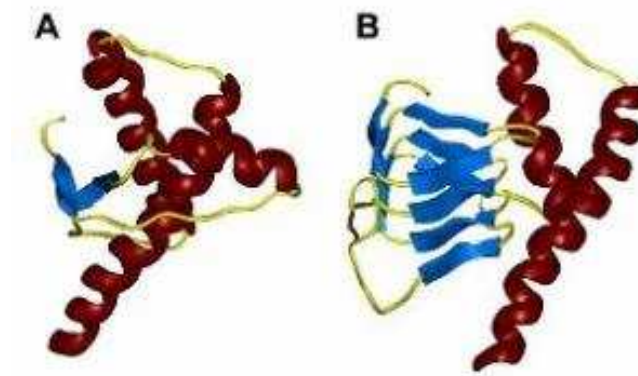


Abbildung 3: Dreidimensionale Strukturen des Prion-Proteins.

A: Die zelluläre Form (PrP^c) besteht überwiegend aus α -helikalen Strukturen (rote Spiralen) und nur geringem Anteil an β -Faltblatt-Strukturen (blaue Pfeile). B: Die pathologische Isoform (PrP^{sc}) entsteht nach Konversion von PrP^c zu PrP^{sc}; es überwiegt der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen (blaue Pfeile) gegenüber den α -helikalen Strukturen (rote Spiralen) (Abbildung: Govaerts, Prusiner, Cohen, University of California, San Francisco; http://cmp.ucsf.edu/Faculty/pdb_show.html?id=cohen).

Die Proteinase K-Schnittstellen variieren bei verschiedenen Formen der TSE. Außerdem ergeben sich unterschiedliche Glykosylierungsverhältnisse, sogenannte Glykopprofile, anhand derer eine genaue Unterscheidung der verschiedenen TSE-Erreger möglich ist. Sie werden als Prionen-Stämme, sogenannte „strains“ bezeichnet. Zusätzlich sind aber auch innerhalb einer TSE-Form deutlich voneinander zu unterscheidende Stämme feststellbar. Anhand des Glykosylierungsprofils kann beispielsweise eine atypische Form von Scrapie klar von der klassischen abgegrenzt werden. Eine exakte Charakterisierung ist bei Übertragung der einzelnen Isolate ins Mausmodell möglich (Bruce *et al.* 1992; Bruce 1996). Neben dem Glykopprofil dienen auch die neuropathologischen Veränderungen zur genauen Bestimmung eines „strains“. Hierbei wird ein Läsionsprofil nach einer bestimmten Methode, dem sogenannten „Lesion Profile Scoring“ (Fraser and Dickinson 1968), erstellt. Ein weiteres Kriterium sind Inkubationszeit und klinische Symptome. Von einem Stamm spricht man dann, wenn die Charakteristika unter gleichen Bedingungen in einer Mauslinie konstant und reproduzierbar sind. Um eine gleichbleibende Stabilität zu erreichen sind jedoch mehrere Passagen in einer Mauslinie nötig. Dabei ist die Variation der Stämme abhängig von der PrP-Konformation und der Glykosylierung (DeArmond *et al.* 1997; Somerville 1999; Telling *et al.* 1996).

Außer im Zentralen Nervensystem kann bei den meisten TSE Infektiosität auch im Lymphoretikulären System (LRS) nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der Beteiligung variiert. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die verschiedenen Prionen-Stämme auch in ihrem Gewebetropismus unterscheiden (Aguzzi 2004). So ist bei sporadischer Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) und der neuen Variante (vCJD) sowie bei Scrapie-kranken Schafen und Ziegen, bei der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) der Rinder und Chronic

Wasting Disease der Hirschartigen (CWD) das LRS mitbetroffen (Bruce *et al.* 2001; Glatzel *et al.* 2003; Mabbott and Bruce 2003; Sigurdson *et al.* 1999). Teilweise tritt PrPsc-Infektiosität schon im LRS auf, bevor es im ZNS nachweisbar ist (Doi *et al.* 1988). Bei Schafen mit Scrapie und bei Menschen mit vCJD ist beispielsweise die PrPsc-Akkumulation in den Tonsillen sehr hoch. Daher kann eine Tonsillenbiopsie in beiden Fällen für eine frühzeitige Diagnose der TSE herangezogen werden.

Nach peripherer Exposition verläuft die Pathogenese von Prionen-Erkrankungen in drei Schritten: 1. Infektion und periphere Replikation, 2. Einwanderung von der Peripherie zum ZNS und 3. Progressive Neurodegeneration (Aguzzi and Heikenwalder 2005). PrPsc ist assoziiert mit Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) (Kitamoto *et al.* 1991) in lymphoidem Gewebe wie Milz, Tonsillen, Peyerschen Platten und Lymphknoten (Mabbott *et al.* 2000; Montrasio *et al.* 2000). Mäuse ohne FDC und ohne eine organisierte Mikroarchitektur der Milz zeigen eine deutlich verminderte Prionen-Replikation nach peripherer Exposition (Prinz *et al.* 2002). Ebenso scheint das Komplement-System relevant für die Entstehung einer TSE zu sein. Mäuse, denen Komplement-Faktoren fehlen, zeigten eine verstärkte Resistenz gegenüber peripherer Inokulation (Klein *et al.* 2001; Mabbott *et al.* 2001). In den Peyerschen Platten ist PrPsc sehr früh nachweisbar. Der Transport vom Darm in das lymphoide System ist jedoch weiterhin unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass M-Zellen, spezialisierte Epithelzellen des Ileums, möglicherweise der Ort des Prionen-Eintritts sind (Heppner *et al.* 2001). Weiterhin wird eine Ausbreitung über Nervenfasern diskutiert. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Weiterverbreitung von Prionen in lymphatische Gewebe und in das periphere Nervensystem auch über Makrophagen stattfindet (Takakura *et al.* 2011). Da lymphoide Organe vor allem sympathisch innerviert sind, liegt eine Verbreitung über sympathische Nerven nahe, deren terminale Fasern nicht myelinisiert und somit zugänglich sind. Eine Studie mit Rindern, denen eine hohe Dosis an BSE oral verabreicht wurde, ergab Hinweise auf eine simultane Ausbreitung von Prionen sowohl über parasympathische Nervenfasern des Vagus-Nerves zum Gehirn als auch über sympathische Nerven zum Rückenmark und schließlich ins Gehirn (Hoffmann *et al.* 2007). Außerdem wird der Nervus olfactorius als eine mögliche Eintrittspforte für Prionen angesehen (Bessen *et al.* 2009). Neuere Untersuchungen ergaben, dass auch prionenhaltige Aerosole effiziente Prionenvektoren darstellen und führten zu einer erneuten Diskussion über Sicherheitsstandards in Laboratorien sowie der fleischverarbeitenden Industrie (Haybaeck *et al.* 2011).

Mäuse, bei denen eine chronische Nephritis, Hepatitis oder Pankreatitis induziert wurde und die mit Scrapie infiziert wurden, wiesen PrPsc-Ablagerungen an den Orten der Entzündung auf (Heikenwalder *et al.* 2005). Im Fall einer Nephritis wird PrPsc auch im Urin ausgeschieden (Seeger *et al.* 2005). Dies hat neue Diskussionen über eine mögliche Übertragung und Verbreitung von TSE-Erregern über die Milch bei lebensmittelliefernden Tieren, bei denen eine Mastitis vorlag, ausgelöst. Milch galt nach verschiedenen Studien als unbedenklich (Hadlow *et al.* 1982; Pattison and Millson 1961). Untersuchungen zeigten, dass sich bei Schafen, die mit Scrapie infiziert waren und gleichzeitig eine Mastitis aufwiesen, PrPsc in lymphoiden Follikeln der entzündeten Milchdrüse ablagerte (Ligios *et al.* 2005). Dabei war PrPsc kolokalisiert mit Makrophagen und FDC. Die Ausbildung einer lymphofollikulären Mastitis tritt vor allem bei Maedi-Visna-Virus- und Mykoplasma-Infektionen auf. Dagegen konnte bei Scrapie-infizierten Schafen ohne Mastitis sowie bei Schafen, die zwar eine Entzündung der Milchdrüse aufwiesen, jedoch nicht Scrapie-infiziert waren, PrPsc in der Milchdrüse nicht nachgewiesen werden. Eine Infektion mit Scrapie bei gleichzeitigem Vorliegen einer chronischen Entzündung kann demnach zu einer PrPsc-Akkumulation in sonst nicht betroffenen Geweben führen. Im April 2008 wurde eine Studie veröffentlicht, in der Scrapie-freien Lämmern aus Neuseeland Kolostrum bzw. Milch von Scrapie-kranken Mutterschafen verabreicht wurde. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Risiko einer Übertragung von Scrapie auf Lämmer über die Aufnahme von Kolostrum bzw. Milch durchaus besteht (Konold *et al.* 2008). Dies wurde durch eine weitere Studie bestätigt (Lacroux *et al.* 2008). Eine gleichzeitige Infektion mit dem Maedi-Visna-Virus scheint dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen (Leblanc *et al.* 2006).

Während eine Übertragung von Scrapie über die Plazenta als wahrscheinlich gilt (Andreoletti *et al.* 2002; Race *et al.* 1998), sind die Ergebnisse bezüglich einer maternalen Übertragung von BSE kontrovers. Bisher konnte PrPsc in Plazenten von BSE-infizierten Kühen bzw. im Mausmodell nicht nachgewiesen werden (Castilla *et al.* 2005; Wrathall 1997). Auch die Frage nach einer Übertragung über die Milch ist nicht geklärt. Bei bisherigen Untersuchungen konnte bei Rindern eine Übertragung von BSE über die Milch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Castilla *et al.* 2005; Everest *et al.* 2006). Bedeutender erscheint hier die Übertragung über das Blut (Castilla *et al.* 2005; Houston *et al.* 2008; Hunter *et al.* 2002).

2.2 Das zelluläre Prion-Protein (PrP_c)

Das *PRNP*-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 20, bei Mäusen auf Chromosom 2 lokalisiert. PrP_c ist ein Sialoglykoprotein und findet sich auf der Zellmembran. Es wird über das endoplasmatische Retikulum und sekretorische Vesikel an die Zelloberfläche transportiert und ist über einen GPI-Anker an die Zelloberfläche gebunden (Stahl *et al.* 1987). In nur wenigen Ausnahmen, wie zum Beispiel im Magen und im Darm, wurde PrP_c in Sekretionsgranula der Epithelzellen nachgewiesen (Fournier *et al.* 1998). Das zelluläre Prion-Protein besteht aus 256 Aminosäuren. Untersuchungen mittels Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) haben gezeigt, dass PrP_c überwiegend aus alpha-helikalen Strukturen und nur wenigen beta-Faltblatt-Strukturen besteht (Riek *et al.* 1996; Zahn *et al.* 2000). Es ist löslich in Detergentien und wird durch Verdau mit Proteinase K vollständig abgebaut.

Die physiologische Funktion dieses Proteins ist noch nicht vollständig verstanden. Das zelluläre Prion-Protein kann unglykosyliert, ein- oder zweimal glykosyliert vorliegen. Mit der Entwicklung von PrP-knock-out-Mäusen (*Prnp*^{0/0}) erhoffte man sich Hinweise auf die Funktion des Proteins. Doch die Mäuse entwickelten sich normal und waren gesund (Bueler *et al.* 1992). PrP_c scheint somit für die Lebensfähigkeit der Mäuse nicht essentiell zu sein. Es traten lediglich geringe Abweichungen, wie z.B. Veränderungen im Schlafverhalten der Tiere, auf (Tobler *et al.* 1996). *Prnp*^{0/0}-Mäuse sind jedoch resistent gegenüber einer PrP^{Sc}-Infektion (Bueler *et al.* 1993). Die Inokulation dieser Mäuse mit Gehirnhomogenat von Scrapie-kranken Mäusen führte zu keiner Erkrankung. Es konnte keine Verbreitung und keine subklinische Replikation von PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Sailer *et al.* 1994). PrP_c scheint somit für die Prionen-Replikation essentiell zu sein. Brandner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PrP_c außerdem nötig ist für eine Schädigung von Neuronen nach Prionen-Inokulation (Brandner *et al.* 1996). PrP^{0/0}-Neuronen, die an infizierte PrP^{+/+} Gehirnimplantate angrenzen, zeigen keine Schädigung.

PrP_c wird vor allem in Neuronen, aber auch in anderen Zellen wie z.B. Gliazellen, Lymphozyten, Follikulär-Dendritischen Zellen (FDC), im Pankreas, im Bronchus-assoziierten Lymphgewebe der Lunge (BALT), Perizyten von Blutgefäßen und in der Nebenniere sowie in der Skelettmuskulatur exprimiert (Ford *et al.* 2002). Im Gehirn konnte PrP_c an präsynaptischen Nervenendigungen nachgewiesen werden (Fournier *et al.* 1995; Haeblerle *et al.* 2000), was vermuten lässt, dass PrP_c eine Rolle bei der synaptischen Übertragung spielt. Weitere Untersuchungen zeigen, dass PrP_c Kupfer-Ionen bindet und somit möglicherweise wichtig für den neuronalen Kupfer-Metabolismus ist (Brown *et al.* 1997a; Stockel *et al.* 1998). Weiterhin

wird eine Beteiligung von PrPc beim Transport von Eisen vermutet (Singh *et al.* 2009). Der Laminin-Rezeptor wurde als Rezeptor für die zelluläre Aufnahme von sowohl PrPc als auch PrPsc beschrieben (Gauczynski *et al.* 2001; Gauczynski *et al.* 2006). In den letzten Jahren fanden sich Hinweise darauf, dass PrPc eine wichtige Rolle bei der zellulären Abwehr gegenüber oxidativem Stress spielt. Zellen von PrP^{0/0}-Mäusen sind anfälliger gegenüber oxidativem Stress als Zellen von Wildtyp-Mäusen (Brown *et al.* 1997b). Andere Studien an PrP^{0/0}-Mäusen zeigten eine Erhöhung von oxidativen Stress-Markern in vivo verglichen zu den Wildtyp-Mäusen (Brown *et al.* 2002; Wong *et al.* 2001). Möglicherweise besteht die Pathogenese der TSE teilweise in dem Verlust einer Schutzfunktion des zellulären Prion-Proteins hinsichtlich der Bewältigung von oxidativem Stress (Giese and Kretzschmar 2001). Neuerdings wurden weitere Proteine, wie Neurofascin und M6-a identifiziert, die möglicherweise in Wechselwirkung mit PrPc stehen (Rutishauser *et al.* 2009). Zahlreiche Studien weisen außerdem auf eine Beteiligung von PrPc beim transmembranen Signaling und der Zelladhäsion hin. Bisher bleibt die physiologische Relevanz der nachgewiesenen Interaktionen jedoch unklar (Westergard *et al.* 2007). Auch die Frage, ob der Verlust der biologischen Aktivität von PrPc nach Kontakt mit PrPsc oder aber neurotoxische Eigenschaften von PrPsc selbst die Pathogenese beeinflussen, ist nicht geklärt (Westergard *et al.* 2007). Eine physiologische Funktion des zellulären Prion-Proteins und deren Bedeutung für die Verbindung zu möglichen Interaktions-Partnern konnte jedoch in einer neueren Studie gezeigt werden. Bremer und Mitarbeiter zeigten, dass *Prnp*^{0/0}-Mäuse eine chronische demyelinisierende Polyneuropathie entwickeln und konnten PrPc als wichtige Verbindung in der transzellulären axomyelinischen Interaktion identifizieren (Bremer *et al.* 2010).

2.3 Speziesbarriere und Übertragung

Durch Übertragungsversuche von unterschiedlichen Prionen-Stämmen auf verschiedene Tierarten konnte nachgewiesen werden, dass es unterschiedlich stark ausgeprägte Barrieren zwischen den Spezies gibt. Dies zeigt sich in vergleichsweise sehr langen Inkubationszeiten oder in der Tatsache, dass keine Erkrankung bzw. Infektiosität im Gewebe nachgewiesen werden kann. Es gibt dabei mehrere Faktoren, die bei der Ausbildung einer Speziesbarriere eine Rolle spielen: 1. Unterschiedliche PrP-Sequenzen zwischen Prionen-Donor und -Empfänger, 2. Der Prionen-Stamm und 3. Die Spezies-Spezifität des Protein X (Prusiner 1998). So konnte z.B. die Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME) experimentell auf Schafe, Ziegen und Hamster, nicht aber auf Mäuse übertragen

werden (Marsh *et al.* 1969). BSE kann experimentell auf Mäuse, nicht aber auf Hamster übertragen werden (Dawson *et al.* 1991; Fraser *et al.* 1988).

Normalerweise ist die Inkubationszeit während der ersten Passagen in einer neuen Spezies verlängert und/oder uneinheitlich. Schließlich verkürzt sie sich nach einigen Passagen und klinische sowie histologische Merkmale werden einheitlicher. Die dabei zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht bekannt. Innerhalb der verschiedenen Mauslinien ist die Empfänglichkeit für verschiedene Prionen-Stämme wiederum variabel. Außerdem ist die Entstehung einer Erkrankung abhängig von der Inokulationsdosis und dem Inokulationsweg. Im Mausmodell werden verschiedene Inokulationswege angewendet. Die intrazerebrale (ic) Inokulation ist die effizienteste, aber auch unnatürlichste Übertragung. Daneben gibt es verschiedene periphere Wege wie die intravenöse (iv), intraperitoneale (ip), intramuskuläre (im), subkutane (sc) und orale bzw. intragastriale (ig) Inokulation. Mit der Herstellung von transgenen Mäusen, die das zelluläre Prion-Protein von anderen Spezies wie z.B. das ovine, bovine oder humane PrPc anstelle des Maus-PrPc exprimieren, ist es möglich, im Mausmodell das eventuelle Vorhandensein von Speziesbarrieren oder zumindest die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Übertragung zu untersuchen.

Bei Untersuchungen zur Speziesbarriere stieß man auf subklinische Infektionen. Im Gegensatz zu präklinischen Infektionen bleiben die Tiere mit subklinischen Verläufen während der gesamten Lebensdauer asymptomatische Träger von Infektiosität. Da Prionen-Erkrankungen ausgesprochen lange Inkubationszeiten aufweisen, ist die Unterscheidung zwischen prä- und subklinischen Verläufen teilweise schwierig. Die Bezeichnung „subklinische Infektion“ wird dann gebraucht, wenn Prionen-Replikation ohne die Ausbildung klinischer Symptome während der normalen Lebensdauer auftritt (Hill and Collinge 2003). Mäuse sind beispielsweise resistent gegenüber dem Hamster-Scrapie-Stamm 263K (Kimberlin *et al.* 1989). Nach ic-Inokulation bleiben alle Mäuse klinisch gesund. Race und Mitarbeiter untersuchten die Gehirne der Tiere über einen Zeitraum von 782 Tagen sowohl auf Hamster-PrPres als auch auf Maus-PrPres (Race *et al.* 2001). Hamster-PrPres ließ sich kurz nach der Infektion nachweisen. Zwischen Tag 5 und Tag 240 war weder Hamster- noch Maus-PrPres nachweisbar und ab 310 Tagen waren 13 von 36 inokulierten Mäusen positiv für Maus-PrPres, aber nicht für Hamster-PrPres. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass einerseits eine subklinische Infektion vorlag (alle Mäuse waren über den gesamten Beobachtungszeitraum klinisch unauffällig) und sich andererseits das infektiöse Agens in den Mäusen verändert hatte. Eine weitere Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen und wies ebenfalls Infektiosität in Geweben von

klinisch gesunden Tieren und eine „de novo Prion-Replikation“ nach (Hill *et al.* 2000; Race *et al.* 2001).

Subklinische Verläufe treten nicht nur beim Überschreiten der Speziesbarriere auf. Sie konnten auch nach Inokulation sehr geringer Dosen von zwei mauspathogenen Prionen-Stämmen (RML und ME7) in tga20-Mäusen beobachtet werden (Thackray *et al.* 2002). Dabei trat bei einigen dieser Tiere ein Schwanken zwischen sehr geringgradigen Scrapie-Symptomen und einem vollkommen gesunden Erscheinungsbild auf. Interessanterweise wiesen Tiere mit subklinischer Infektion, die 200 Tage nach Inokulation getötet wurden, eine ähnlich hohe Menge an Infektiosität auf wie terminal kranke Mäuse (Thackray *et al.* 2002). Die dabei verwendeten tga20-Mäuse überexprimieren das zelluläre Prion-Protein um den Faktor zehn und haben wesentlich kürzere Inkubationszeiten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Fischer *et al.* 1996).

2.4 Neuropathologie

TSE sind gekennzeichnet durch das Auftreten von drei charakteristischen Veränderungen im ZNS, nämlich durch eine spongiforme Degeneration, eine astrozytäre Gliose und den Nachweis von PrPsc. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die pathologischen Mechanismen zur Entstehung dieser drei Merkmale und ihr Zusammenhang noch immer ungeklärt.

Astrozyten sind wichtig für die Ernährung und Struktur von Neuronen sowie die Regulation von lokalen Konzentrationen von Neurotransmittern und Ionen. Das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ist der am häufigsten gebrauchte Marker für Astrozyten. Es gehört zur Klasse III der Intermediärfilamente (Gomes *et al.* 1999). Eine reaktive Gliose infolge einer Ablagerung von unlöslichen Proteinen im Gehirn kommt auch bei anderen Erkrankungen wie beispielsweise bei der Alzheimer-Krankheit oder beim Down-Syndrom vor. In TSE spielt möglicherweise die Interaktion von PrPsc mit GFAP eine Rolle. Aktivierte Astrozyten treten häufig dicht bei Prionen-Plaques auf und umgeben diese mit ihren Fortsätzen (Ye *et al.* 1998b). Es konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von PrPsc mit der Menge der GFAP-mRNA korrelieren und weniger mit der Ausbildung von Vakuolen (Manuelidis *et al.* 1987). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Astrozyten selbst PrPsc produzieren oder akkumulieren, was zu einer noch stärkeren Ausbildung der Astrozytose führt (Ye *et al.* 1998a). In diesem Fall würden Astrozyten ebenso eine aktive wie reaktive Rolle in der TSE-Pathogenese spielen (Fraser *et al.* 2003). Neben Astrozyten sind auch Mikroglia an der Pathogenese von TSE beteiligt (Rezaie and Lantos 2001) (Abb. 4). Sie werden ebenfalls durch PrPsc aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Neurotoxizität von PrP²⁷⁻³⁰ mit der Expression von PrPc

sowie der Aktivierung von Mikroglia gekoppelt ist (Giese *et al.* 1998). Schließlich wird eine mögliche direkte Neurotoxizität von PrPsc selbst diskutiert (Chiesa and Harris 2001; Forloni *et al.* 1993).

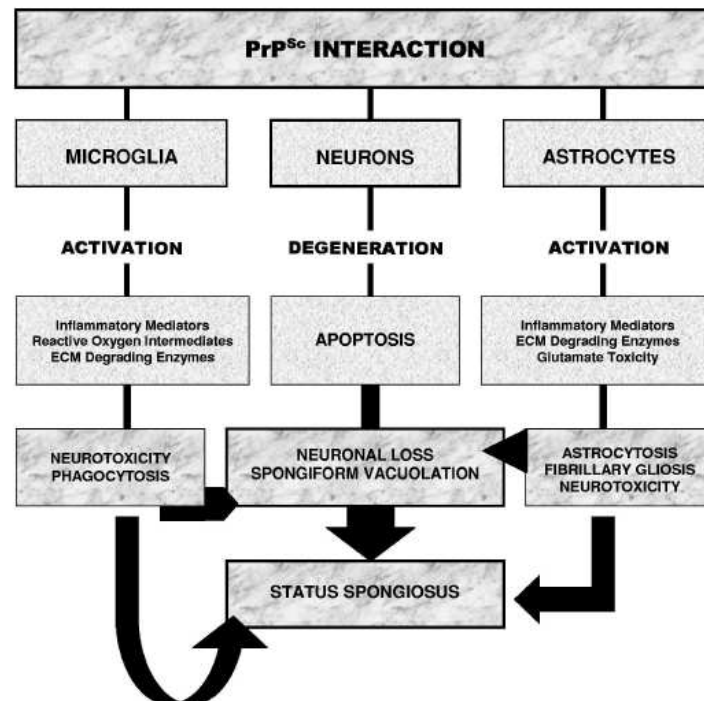


Abbildung 4: Schema zur Pathogenese der TSE: Interaktion von PrPsc und Zellen des ZNS (Rezaie and Lantos 2001).

Die Verteilung der Läsionen im Gehirn variiert bei den verschiedenen TSE und ist charakteristisch für einzelne Prionen-Stämme. Bei der Verteilung von PrPsc-Ablagerungen kann außerdem die Art der Akkumulationen unterschiedlich sein. PrPsc kann sich intraneuronal, auf der Oberfläche von Neuronen oder im Neuropil anreichern. Es kann diffus verteilt sein, als feingranuläre Ablagerungen oder als sogenannte PrP-Plaques (Sikorska *et al.* 2009) vorkommen.

2.5 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Tieren

2.5.1 Scrapie

Die älteste bekannte TSE ist Scrapie. Sie kommt bei Schafen, Ziegen und Moufflons vor und wird auch als Traberkrankheit bezeichnet. Scrapie gilt als der Prototyp der Prionen-Erkrankungen. Bereits Mitte des 18. Jahrhunderts wurde Scrapie als tödlich verlaufende Erkrankung beim Schaf beschrieben. 1937 verendeten in Schottland nach Verabreichung eines Formalin-behandelten Impfstoffes gegen „Louping ill“, der aus kontaminierten Gehirnen von erkrank-

ten Schafen hergestellt worden war, mehrere hundert Schafe an Scrapie. Bereits 1939 wurde die experimentelle Übertragung von Scrapie beschrieben (Cuille and Chelle 1939) und es verhärtete sich der Verdacht, dass es sich um einen übertragbaren Erreger handelte (Bessen 1996).

Die Infektionswege sind nur teilweise bekannt. Als sicher gilt die horizontale Übertragung (Ryder *et al.* 2004), z.B. durch infektiöse Nachgeburten auf Weiden. Außerdem wird eine vertikale Übertragung peri- und post partum vom Muttertier auf das Lamm vermutet (Brotherston *et al.* 1968; Pattison *et al.* 1974).

Inzwischen ist bekannt, dass verschiedene Genotypen des Schafs mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für Scrapie korrelieren (Belt *et al.* 1995; Goldmann *et al.* 1994). An Codon 136, 154 und 171 des *Prnp*-Gens treten Polymorphismen auf, die bei den einzelnen Schafrassen unterschiedlich oft vorkommen. Es ergeben sich durch Austausch der Aminosäuren an den genannten Codons fünf verschiedene Allele: VRQ, ARQ, ARH, AHQ und ARR. Dabei gilt der PrP Haplotyp ARR bei den meisten Schafrassen als nahezu resistent, der VRQ Haplotyp dagegen als am stärksten empfänglich für Scrapie (Belt *et al.* 1995; Hunter *et al.* 1996). In der Europäischen Union wurden daher Zuchtprogramme für Schafe mit resistenten Genotypen beschlossen (Entscheidung der Kommission 2003/100/EG).

In den letzten Jahren wurden verschiedene atypische Scrapie-Fälle beschrieben. 1998 wurden in Norwegen die ersten Fälle entdeckt und als Nor98 bezeichnet (Benestad *et al.* 2003). Durch ein abweichendes Reaktionsmuster bei Schnelltests war man auf diese neue Form von Scrapie aufmerksam geworden. In der Western Blot Analyse zeigte sich ein abweichendes Glykosylierungsverhältnis mit einer Bande mit niedrigerer molekularer Masse (11-12 oder 7-8 kDa) als in klassischen Scrapie-Fällen, die mit einer verminderten PK-Resistenz dieses Erregers einhergeht (Benestad *et al.* 2008). Zudem konnte bisher im Gegensatz zu klassischen Scrapie-Fällen PrP^{Sc} nicht im lymphoretikulären System der Tiere nachgewiesen werden (Buschmann *et al.* 2004; Nentwig *et al.* 2007). Vakuolisierung trat vor allem im Kleinhirn und im cerebralen Cortex und nur in geringem Maße im Hirnstamm auf. Alle fünf untersuchten Schafe hatten den Genotyp AHQ/ARQ oder AHQ/AHQ im Gegensatz zu den bis dahin aufgetretenen Fällen von klassischer Scrapie in Norwegen, die immer mit dem VRQ Allel assoziiert waren (Tranulis *et al.* 1999). Mittlerweile sind auch in anderen europäischen Ländern sowie in Nord-Amerika atypische Fälle von Scrapie nachgewiesen worden (Buschmann *et al.* 2004; Cook 2007; De Bosschere H. *et al.* 2004; Onnasch *et al.* 2004). Interessanterweise scheinen die als weitgehend resistent eingestuften Genotypen (ARR) ebenfalls empfänglich

für diese Form von Scrapie zu sein (Le Dur *et al.* 2005). Dies stellte die von der Europäischen Kommission beschlossenen Zuchtprogramme in Frage. Die Entscheidung wurde daher im Juni 2007 wieder aufgehoben (Verordnung (EG) Nr. 727/2007 der Kommission). Mittlerweile konnten auch Fälle von klassischer Scrapie in ARR/ARR-Schafen nachgewiesen werden, die sich klar von BSE und atypischer Scrapie unterscheiden ließen (Groschup *et al.* 2007). Auch bei Ziegen wurde das Auftreten von atypischen Fällen von Scrapie in Frankreich, Italien und der Schweiz beobachtet (Seuberlich *et al.* 2007). Die erfolgreiche Übertragung von Isolaten der atypischen Form in tg338-Mäuse, die das ovine PrP überexprimieren (VRQ Allel) (Le Dur *et al.* 2005), sowie innerhalb des natürlichen Wirtes Schaf (Simmons *et al.* 2007) weisen darauf hin, dass es sich um einen stabilen Scrapie-Stamm handeln könnte. Dennoch tritt die atypische Form natürlicherweise wesentlich seltener auf als die klassische Form. Möglicherweise hängt dies mit der stärkeren Empfindlichkeit gegenüber Proteasen zusammen, was den Stamm auch weniger robust gegenüber Umwelteinflüssen macht (Simmons *et al.* 2007). Diskutiert wurde daher auch das Vorliegen eines spontanen genetischen Geschehens, ähnlich den familiären Formen beim Menschen (z.B. GSS, familiäre CJD oder FFI, siehe auch Kapitel 2.6), die ebenfalls experimentell übertragbar sind (Masters *et al.* 1981; Telling *et al.* 1996).

Scrapie ist weltweit verbreitet, nur Australien und Neuseeland gelten als Scrapie-frei. Aufgrund unzureichender Überwachungsprogramme ist der tatsächliche Scrapie-Status einiger Länder jedoch unbekannt (Anonym 2008c). Bisher konnte kein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Scrapie und humanen TSE aufgezeigt werden.

Generell sind Schafe im Alter zwischen zwei und fünf Jahren betroffen (Hoinville 1996); für die atypische Form von Scrapie wird auch von einer signifikanten Anzahl von Tieren älter als fünf Jahre berichtet. Die Inkubationszeit liegt zwischen mehreren Monaten und vier Jahren. Klinisch treten zunächst unspezifische Verhaltensstörungen wie Orientierungsprobleme, Absonderung von der Herde oder starrer Blick auf, die nur bei regelmäßiger und genauer Beobachtung der Tiere auffallen. Im Verlauf werden dann neurologische Ausfallerscheinungen deutlicher. Die klassischen Symptome sind starker Juckreiz (englisch: to scrape: kratzen), Koordinationsstörungen, Zittern, Übererregbarkeit, fortschreitende Ataxie bis hin zum Festliegen der Tiere sowie Gewichtsverlust. Zusätzlich können Krämpfe und Blindheit sowie der sogenannte „Knabber-Reflex“ auftreten, bei dem das Tier auf Palpation im Rücken-Lenden-Bereich mit charakteristischen Bewegungen der Lippe und der Zunge reagiert (Healy *et al.* 2003). Bezüglich der Abgrenzung zu der atypischen Form von Scrapie zur klassischen Variante wurde lediglich ein häufigeres und deutlicheres Auftreten von Ataxie beschrieben (Konold *et al.* 2007). Aufgrund der starken Variabilität der klinischen Symptome sollte die

Diagnose Scrapie generell bei neurologischen Symptomen unklarer Ätiologie in Betracht gezogen werden (Konold *et al.* 2006). Differentialdiagnostisch sind Listeriose, Aujeszky'sche Krankheit, Maedi-Visna, Borna'sche Krankheit, Ketose sowie Intoxikationen und Ektoparasitosen zu berücksichtigen.

2.5.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Wells *et al.* beschrieben 1987 die ersten Fälle einer bis dahin unbekannten zentralnervösen Erkrankung bei drei bis sechs Jahre alten Holstein/Friesian Rindern aus vier verschiedenen Herden in Großbritannien und ordneten sie den TSE zu. Sie bezeichneten sie als „Bovine Transmissible Enzephalopathie“ (BSE) (Wells *et al.* 1987). Zunächst lieferten umfangreiche epidemiologische Untersuchungen Hinweise zum Verständnis der Erkrankung (Wilesmith *et al.* 1988; Wilesmith *et al.* 1991). Die Krankheit trat zunächst hauptsächlich in Milchviehherden im Süden des Landes auf und wurde später auf der gesamten Insel registriert (Miels *et al.* 2001). Ein Vergleich zwischen Milch- und Fleischrinderherden in Großbritannien zeigte eine deutlich höhere Inzidenz der Krankheit in Milchrinderherden (Nathanson *et al.* 1997). Da Tiermehle in wesentlich größeren Mengen an Milchrinder als an Fleischrinder verfüttert werden, lieferte dies ebenfalls einen Hinweis für die Übertragung der Erkrankung durch Verfütterung kontaminierter Tiermehle (Nathanson *et al.* 1997; Wilesmith *et al.* 1992). Die als Kraftfutter eingesetzten kontaminierten Tiermehle, die durch Änderungen im Herstellungsverfahren für Tierkörpermehl Ende der 1970er Jahre ungenügend inaktiviert waren, wurden als Ursache der BSE verantwortlich gemacht. Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln und damit verbundene Erhitzungsschritte entfielen und unzureichend inaktivierte TSE-Erreger verblieben im Tierkörpermehl. In Deutschland wurde zudem eine Verbreitung von BSE über infektiöse Milchaustauscher diskutiert (Kamphues 1997).

1994 wurde ein EU-weites Verfütterungsverbot von Tiermehl an Wiederkäuer beschlossen, das im Dezember 2000 auf ein Verfütterungsverbot von Tiermehl an jegliche Tierarten ausgeweitet wurde.

Die meisten BSE-Fälle wurden in Großbritannien registriert mit einem Maximum in den Jahren 1992 (37.280 Fälle) und 1993 (35.090 Fälle) (Anonym 2011a). Seitdem sind die Zahlen in Großbritannien kontinuierlich gesunken und lagen im Jahr 2010 bei 11 und bis Ende Juni für das Jahr 2011 bei 3 Fällen. Mittlerweile sind aus allen EU-Ländern BSE-Fälle bekannt und auch weltweit, z.B. in den USA und Japan, tritt BSE auf (Anonym 2011b) (Abb. 5). In Deutschland trat der erste BSE-Fall 1992 auf, wobei es sich hierbei um ein importiertes Tier handelte. Die bisher höchsten Zahlen wurden in Deutschland mit 125 Fällen im Jahr

2001 und 106 Fällen im Jahr 2002 registriert. Seitdem gehen auch in Deutschland die gemeldeten BSE-Fälle zurück; im Jahr 2009 lag die Zahl bei zwei positiv getesteten Tieren und für 2010 wurden keine BSE-Fälle gemeldet (Anonym 2011b).

Zusätzlich zu dem Verfütterungsverbot von Tiermehlen wurde durch die Verordnung (EG) Nr. 999/2001 vom 22. Mai 2001 (zuletzt geändert am 03.02.2009) die Entfernung spezifizierter Risikomaterialien bei der Schlachtung von Rindern, Schafen und Ziegen beschlossen. Danach gelten bei Rindern Schädel ohne Unterkiefer, jedoch einschließlich Gehirn und Augen sowie Rückenmark von über 12 Monate alten Rindern sowie die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, aber einschließlich der Spinalganglien, von über 30 Monate alten Rindern und die Tonsillen, die Eingeweide von Duodenum bis Rektum und das Gekröse bei Rindern jeden Alters als Risikomaterial. Bei Schafen und Ziegen gelten Schädel, einschließlich Gehirn und Augen, Tonsillen und Rückenmark von über 12 Monate alten Tieren sowie die Milz und das Ileum von Schafen und Ziegen jeden Alters als Risikomaterial.

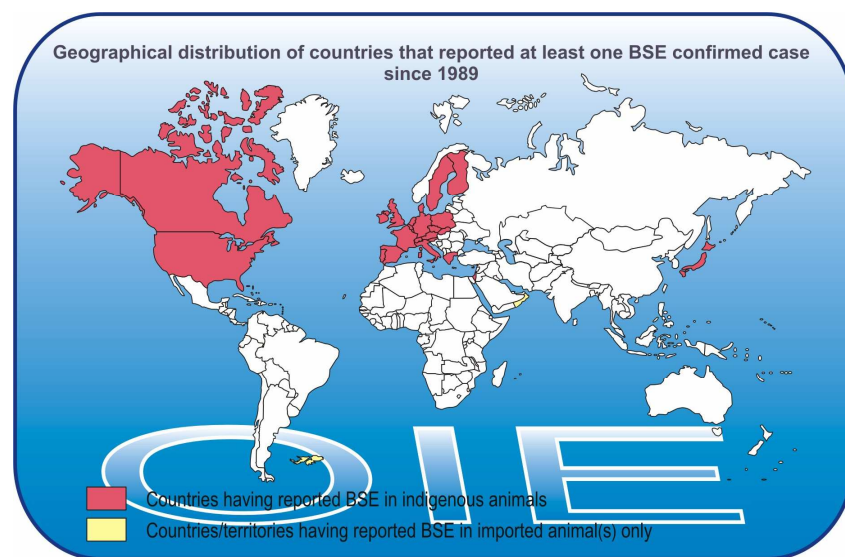


Abbildung 5: Weltweite Verbreitung von BSE (Quelle: Office International des Epizooties (OIE); World Organisation for Animal Health ; <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/map>).

Mit der Einführung von BSE-Schnelltests im Jahr 2000 werden zudem EU-weit alle geschlachteten bzw. verendeten Rinder, die über 30 Monate alt sind, auf BSE untersucht. Deutschland hatte damals das Testalter auf 24 Monate heruntersetzt. Mittlerweile gelten jedoch auch in Deutschland die EU-weit einschlägigen Vorgaben mit einem Testalter von über 30 Monaten. Bei Notschlachtungen liegt das Testalter weiter bei 24 Monaten. Diese EU-weite Maßnahme führte dazu, dass teilweise bis dahin BSE-freie Länder die ersten positiven Fälle meldeten. Das bisher jüngste positiv getestete Rind war 20 Monate alt (Ducrot *et al.* 2008).

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung durch Verhaltensänderungen wie Ängstlichkeit oder Aggressivität sowie Überempfindlichkeit gegenüber Berührung, Lärm und Licht. Es kommt zu Bewegungsstörungen und mit fortschreitender Ataxie und Schwäche zum Festliegen der Tiere. Der bei Scrapie stark ausgeprägte Juckreiz kommt bei Rindern nicht oder nur in sehr abgeschwächter Form vor. Es erkranken Rinder ab einem Alter von 20 Monaten; das Durchschnittsalter liegt bei vier bis sechs Jahren und der klinische Verlauf kann bis zu sechs Monaten andauern (Anonym 2008a; Miels *et al.* 2001). Wie auch bei Scrapie sind die klinischen Symptome vor allem zu Beginn der Erkrankung variabel und unspezifisch. Differentialdiagnostisch müssen hier Ketose, Hypomagnesie, Listeriose und Intoxikationen in Betracht gezogen werden (Anonym 2008a).

Der Ursprung des BSE-Erregers ist weiterhin unklar. Aufgrund der starken Verbreitung von Scrapie bei Schafen in Großbritannien wird eine Kontamination von Tiermehlen mit Scrapie durch Verarbeitung von verseuchten Schafkadavern diskutiert (Nathanson *et al.* 1997). Da sich Scrapie und BSE-Isolate jedoch deutlich voneinander unterscheiden lassen (Bruce 1996), ist fraglich, ob tatsächlich der Scrapie-Erreger als Ursache für BSE in Frage kommt. Dies würde bedeuten, dass es in der gesamten Kette zu einer Veränderung des Erregers gekommen sein muss, möglicherweise durch das neue Verfahren in der Herstellung von Tiermehlen Mitte der 1970er Jahre. Scrapie konnte experimentell intrazerebral auf Rinder übertragen werden; es ergaben sich jedoch nicht die für BSE typischen Kennzeichen und Läsionen (Clark *et al.* 1995; Cutlip *et al.* 1994). Auch die intrazerebrale Übertragung von Scrapie in transgene Mäuse, die das bovine Prion-Gen exprimieren, ergab neuropathologische Veränderungen, die sich deutlich von denen nach Übertragung von BSE bzw. vCJD unterschieden (Scott *et al.* 1999). Nach experimenteller oraler Übertragung von Scrapie auf Rinder zeigte keines der Tiere klinische Symptome. Ebenso konnten weder Läsionen noch PrPsc in den Gehirnen und im Rückenmark der infizierten Tiere nachgewiesen werden (Cutlip *et al.* 2001). Weiterhin wird diskutiert, ob möglicherweise der BSE-Erreger selbst durch Verarbeitung von infizierten Rindern zu Tiermehl immer wieder in die Nahrungskette gelangt ist. Neuerdings wird eine weitere Theorie diskutiert, in der die Autoren davon ausgehen, dass der Ursprung der Erkrankung möglicherweise von der Übertragung humanem Materials ausging (Colchester and Colchester 2005).

Bisher ging man davon aus, dass es sich bei BSE um einen einzigen Prionen-Stamm handelt, denn bisher waren sämtliche untersuchten BSE-Isolate phänotypisch ähnlich und biochemisch nicht zu unterscheiden (Collinge *et al.* 1996; Kuczius *et al.* 1998; Kuczius and Groschup 1999). In jüngster Zeit wurden jedoch zwei sogenannte atypische BSE-Fälle bei Rindern in

Frankreich (Biacabe *et al.* 2004) und Italien (Casalone *et al.* 2004) beschrieben. Der in Frankreich entdeckte Fall war charakterisiert durch eine höhere molekulare Masse des unglykosilierten PrPsc und wird als „H-type“ (BSE-H) bezeichnet. Bei dem in Italien beschriebenen Fall zeigte sich eine abweichende Verteilung von PrPsc im Gehirn und amyloide Plaques, die dieser Form zunächst die Bezeichnung „Bovine Amyloide Spongiforme Enzephalopathie“ (BASE) einbrachte. Außerdem zeigte sich biochemisch eine niedrigere molekulare Masse des nicht-glykosilierten PrPsc und führte zu der Bezeichnung „L-type“ (BSE-L). Mittlerweile sind aus verschiedenen anderen Ländern weitere atypische BSE-Fälle gemeldet worden, unter anderem auch aus Schweden, wo bis 2006 noch kein BSE-Fall registriert worden war (Buschmann *et al.* 2006; Ducrot *et al.* 2008). Das Alter der betroffenen Tiere lag zwischen 6 und 18 Jahren mit einer deutlichen Ausnahme, die in Japan bei einem erst 23 Monate alten Rind auftrat (Yamakawa *et al.* 2003). Der Ursprung dieser neuen, atypischen Formen von BSE ist noch vollkommen unklar. Es werden verschiedene Hypothesen diskutiert wie z.B. eine wesentliche Veränderung des BSE-Erregers, eine möglicherweise andere Quelle von TSE, eine bisher unerkannte Form der TSE (Baron *et al.* 2007b) oder Mutationen des *PRNP* als genetischen Ursprung für atypische BSE (Richt and Hall 2008; Stack *et al.* 2009). Möglicherweise handelt es sich auch um eine sporadisch auftretende Form der TSE wie sie auch von humanen TSE bekannt ist (Baron *et al.* 2007b; Buschmann *et al.* 2006). Beide Formen der atypischen BSE konnten bereits in Mäuse übertragen werden und waren klar von der klassischen Form unterscheidbar (Beringue *et al.* 2006; Buschmann *et al.* 2006). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass bei der Übertragung des BSE-L in tg650-Mäuse, die das humane Prion-Protein mit Methionin im Codon 129 sechsfach überexprimieren und hochempfindlich für vCJD sind, keine signifikante Speziesbarriere besteht (Beringue *et al.* 2008). Im Vergleich waren für die Übertragung von klassischer BSE drei Passagen in der Maus nötig, was auf eine deutlich ausgeprägte Speziesbarriere hinweist. Eine Übertragung des BSE-H auf diese Mäuse gelang nicht. Eventuell ist das zoonotische Risiko mit BSE-L demnach höher einzuschätzen als mit klassischer BSE (Beringue *et al.* 2008). Auch eine Übertragung des BSE-L auf Makaken war bereits erfolgreich (Ono *et al.* 2011). Eine neuere Studie zeigte, dass nach intracranialer Gabe von BSE-L- und BSE-H-Isolaten in Rindern keine relevanten PrPsc-Ablagerungen in peripheren Geweben wie z.B. Tonsillen, Milz, Peyersche Platten, Zunge und den retropharyngealen Lymphknoten nachweisbar waren (Balkema-Buschmann *et al.* 2011).

Ein erster Fall von BSE in einer Ziege wurde aus Frankreich beschrieben (Eloit *et al.* 2005). Hierbei zeigte PrPres ähnliche molekulare Eigenschaften wie im Fall von BSE und war auch

nach Übertragung in Mäuse nicht von BSE zu unterscheiden. Inzwischen gibt es aus Großbritannien Hinweise auf einen zweiten Fall von BSE in der Ziege (Jeffrey *et al.* 2006).

2.5.3 Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME)

Noch bevor BSE bekannt wurde, trat auf Zuchtfarmen in den USA die Transmissible Enzephalopathie der Nerze (Transmissible Mink Encephalopathy, TME) auf. Auch hier wird eine orale Übertragung, vor allem durch Scrapie-kontaminiertes Schaffleisch, vermutet. Diskutiert wurde jedoch auch eine Übertragung durch verarbeitetes Rindfleisch (Marsh and Bessen 1993). Die Krankheit wurde 1947 in Wisconsin von Gaylord Hartsough, einem Tierarzt, erstmals berichtet und zunächst als eine Art Vergiftung bzw. als Toxoplasmose eingestuft. Als 1961 und 1963 erneut Fälle auftraten, wurde der Bezug zu einer Übertragung über das Futter und nach morphologischer Untersuchung der Gehirne zu Scrapie hergestellt (Hadlow 1999; Hartsough and Burger 1965). TME trat außerdem in Kanada, Finnland, Russland und Ostdeutschland auf (Marsh and Hadlow 1992). TME-Ausbrüche sind selten; der letzte Ausbruch trat 1985 in Wisconsin, USA, auf (Sigurdson and Miller 2003). Die Verbindung zu Scrapie führte zu weiteren Untersuchungen im Rocky Mountain Laboratory (RML) und in der Universität von Wisconsin. Der Erreger konnte erfolgreich innerhalb der Nerze und in verschiedene andere Tiere wie Schafe, Ziegen, Rhesusaffen und Hamster, aber nicht in die Maus übertragen werden. Zudem waren Nerze nur nach intrazerebraler Inokulation, nicht aber nach oraler Übertragung empfänglich für Scrapie (Baron *et al.* 2007a; Hanson *et al.* 1971; Marsh *et al.* 1991). Eine Übertragung von TME auf Mäuse, die das Nerz-*Prnp*-Gen exprimieren, konnte mittlerweile gezeigt werden (Windl *et al.* 2005). Zudem war eine Übertragung von TME zwischen Rind und Nerz erfolgreich (Hamir *et al.* 2006; Marsh *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1995). BSE konnte im Gegensatz zu Scrapie sowohl intrazerebral als auch oral auf Nerze übertragen werden (Robinson *et al.* 1994), was neue Spekulationen über eine Verbindung zu BSE auslöste. Hierbei gibt es neuerdings Hinweise darauf, dass die BSE-L als Quelle für TME wahrscheinlicher ist als die klassische BSE (Baron *et al.* 2007a).

2.5.4 Chronisch Zehrende Krankheit (Chronic Wasting Disease, CWD)

Die Chronisch Zehrende Krankheit (Chronic Wasting Disease, CWD) ist die einzige bekannte TSE, die bei freilebenden Wildtieren vorkommt. Die ersten Fälle traten in den 1960er Jahren in Colorado bei Cerviden auf, die für Untersuchungen in Gefangenschaft gehalten wurden. Erst 1978 wurde die Erkrankung als TSE erkannt (Williams and Young 1980). 1981 wurde dann auch bei freilebenden Tieren CWD diagnostiziert. Lange Zeit galt CWD als ein

geographisch begrenztes Geschehen in Colorado und Wyoming. Mittlerweile fanden sich jedoch auch Fälle in anderen US-Bundesstaaten sowie in Kanada und Korea, wobei es sich bei den Fällen in Korea um importierte Tiere aus Kanada handelte (Anonym 2008b). Die betroffenen Tiere sind älter als 2 Jahre (durchschnittlich 3 bis 5 Jahre). Die klinischen Symptome sind, wie auch bei anderen TSE, zunächst unspezifisch und zeigen sich in Gewichtsverlust, Verhaltensänderungen, gesenktem Kopf und herabhängenden Ohren. Mit Verlauf der Erkrankung treten deutlichere Symptome wie schlaffe hypotonische Gesichtsmuskeln, starker Speichelfluß, Regurgitation von Pansenflüssigkeit, Pansenatonie sowie Polyurie und Polydipsie auf (Sigurdson and Miller 2003). Infolge der Schluckstörungen können des Weiteren Aspirationspneumonie auftreten. Viele Tiere sind zum Ende der Erkrankung stark abgemagert. Neurologische Symptome wie Ataxie, Kopf-Tremor oder Übererregbarkeit sind meist relativ schwach ausgebildet, vor allem bei Elchen (Anonym 2008b). Die Verteilung der Läsionen im Gehirn ähnelt der von BSE im Rind und Scrapie im Schaf und unterscheidet sich von der Verteilung bei TME (Sigurdson and Miller 2003). PrPsc ist neben dem ZNS auch in Tonsillen und retropharyngealen Lymphknoten (Sigurdson *et al.* 1999) sowie in Pankreas und Skelettmuskulatur zu finden (Angers *et al.* 2006; Fox *et al.* 2006). CWD ist die erste natürlich auftretende TSE, bei der PrPsc auch in der Herzmuskulatur nachgewiesen wurde (Jewell *et al.* 2006). Zudem zeigten Mathiason und Mitarbeiter, dass CWD durch Bluttransfusion übertragbar ist (Mathiason *et al.* 2006). Neuere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass auch bei CWD verschiedene Prionen-Stämme auftreten können (Raymond *et al.* 2007; Sigurdson *et al.* 2006). Bisher konnte CWD nicht in andere Spezies außer Cerviden oral übertragen werden, was auf eine starke Speziesbarriere schließen lässt (Sigurdson 2008). Zudem scheint es eine ausgeprägte Speziesbarriere zum Menschen zu geben. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine erfolgreiche Übertragung von CWD auf Mäuse, die das humane Prion-Protein exprimieren, nicht gezeigt werden (Kong *et al.* 2005; Tamguney *et al.* 2006).

2.5.5 Weitere TSE bei Tieren

Eine weitere TSE wurde erstmals 1990 bei Hauskatzen beschrieben (Feline Spongiforme Encephalopathy, FSE) (Wyatt *et al.* 1990). Bis 2002 waren ca. 100 Fälle fast ausschließlich aus Großbritannien bekannt, weshalb ein Zusammenhang mit BSE hergestellt wurde. Zudem zeigte eine Studie, dass die intrazerebrale Übertragung von Scrapie auf Katzen nicht möglich ist (Hamir *et al.* 2002). Übertragungsversuche von FSE in der Maus zeigten dagegen ein ähnliches Bild wie BSE (Fraser *et al.* 1994). Einzelne Fälle von FSE wurden in Norwegen,

Liechtenstein, Nordirland und in der Schweiz registriert. Auch bei in Zoos gehaltenen Feliden wie Geparden, Löwen, Ozelots, Pumas und Tigern trat diese TSE auf (Doherr 2008). Fälle bei Zootieren wurden aus Australien, Frankreich und Deutschland gemeldet. Als Quelle der Erkrankung wurde mit BSE kontaminiertes Katzenfutter bzw. Schlachtabfälle vermutet. Bisher ist FSE nur bei adulten Tieren beschrieben. Klinisch zeigen sich Bewegungsstörungen. Die Tiere fallen um oder verfehlen beim Sprung ihr Ziel. Häufig zeigen sie einen kriechenden Gang, Aggression, Überempfindlichkeit gegenüber Berührung und Lärm, profuses Speicheln und ein ungepflegtes Fell (Doherr 2008). Neben dem ZNS konnte PrPsc nur teilweise in lymphoidem Gewebe nachgewiesen werden (Ryder *et al.* 2001). Mit den Maßnahmen gegen BSE ging auch die Zahl der gemeldeten FSE-Fälle zurück.

Ebenfalls zeitgleich mit BSE traten bei in Zoos gehaltenen Huftieren Fälle von TSE auf. Hiervon betroffene Arten waren Kudu, Oryx, Antilope, Nyala, Gemsbock und Bison. Auch hier vermutete man eine Übertragung von BSE über kontaminiertes Futter (Doherr 2008).

Die Übertragung von BSE auf Schweine ist bisher nur experimentell nach intrazerebraler, intravenöser und intraperitonealer Inokulation gelungen (Dawson *et al.* 1990; Wells *et al.* 2003b) und die Übertragung von Gehirnmateriale dieser experimentell inokulierten Schweine in die Maus zeigte das charakteristische Bild von BSE (Bruce *et al.* 1994). Eine andere Studie konnte eine subklinische Infektion bei Mäusen, die das porcine Prion-Protein exprimieren, nach intrazerebraler BSE-Inokulation zeigen (Castilla *et al.* 2004a). Dennoch geht man von einer starken Speziesbarriere aus und das Risiko einer natürlich auftretenden TSE in Schweinen wird als sehr gering eingeschätzt (Castilla *et al.* 2004b; Doherr 2008). Eine orale Übertragung von BSE auf Schweine blieb erfolglos (Ryder *et al.* 2000; Wells *et al.* 2003a).

2.6 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bei Menschen

2.6.1 Kuru

Eine der wichtigsten Entdeckungen in der Geschichte der TSE war die in den 1950er Jahren von Gajdusek und Zigas erstmals beschriebene Kuru-Krankheit (Gajdusek and Zigas 1957). Kuru kam beim Stamm der Fore in Papua-Neuguinea vor. Zu dem Stamm zählten ca. 8000 Eingeborene. Zwischen 1957 und 1968 starben über 1100 Angehörige des Stammes an Kuru. Dabei handelte es sich überwiegend um Frauen (60% der Fälle) und nur zu 2% um Männer; der Rest waren Kinder und Jugendliche beider Geschlechter (Alpers and Gajdusek 1965). Bei kannibalistischen Riten der Eingeborenen dieses Stammes, die überwiegend von Frauen durchgeführt wurden, wurde auch das Gehirn der Toten zubereitet und verzehrt (Lindenbaum

1979). Die Kuru-Epidemie ging nach dem Höhepunkt zwischen 1957 und 1961 in den folgenden Jahren stark zurück und tritt heute fast nicht mehr auf, da das entsprechende Totenritual untersagt wurde. Der letzte Todesfall wurde 2005 gemeldet und bis 2008 war kein neuer Fall bekannt (Alpers 2008). Der Ursprung von Kuru ist nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass sich der Erreger in einem Individuum durch spontane Veränderungen im Gehirn zu einem pathogenen, infektiösen Agens entwickelt hat, ähnlich wie bei sporadischer CJD (Alpers and Rail 1971). Das Auftreten von BSE bei Rindern in Verbindung mit vCJD beim Menschen rückte die Erkrankung in den 1990er Jahren wieder in das öffentliche Interesse.

Hadlow stellte erstmals Ähnlichkeiten zwischen Kuru und Scrapie fest (Hadlow 1959). Es sind Menschen von 5 bis zu über 60 Jahren betroffen und die Erkrankung dauert bis zu 2 Jahren an (Collinge *et al.* 2008). Kuru verläuft klassischerweise in drei Stadien. Dem voraus gehen Kopf- und Gelenksschmerzen, die mehrere Monate andauern können. Im ersten, sogenannten ambulanten Stadium, zeigen sich Schwanken beim Gehen oder Stehen, Dysarthrie oder Diplopie. Die Gangataxie verschlimmert sich, Tremor und Dysmetrie entwickeln sich und beim Stehen mit geschlossenen Füßen zeigt sich deutlich ein Aufkrallen der Zehen, um den Stand zu halten. Dieses Symptom gilt als pathognomisch für Kuru (Collinge *et al.* 2008). Das erste Stadium dauert ca. acht Monate. Der Übergang zum zweiten Stadium, das drei bis vier Monate andauert, zeigt sich in fortschreitender Ataxie; die Patienten können ohne Hilfe nicht mehr Gehen. Zudem treten Hyperreflexie und emotionale Labilität auf. Das dritte Stadium ist erreicht, wenn die Menschen nicht mehr ohne Hilfe sitzen können. Es ist gekennzeichnet durch Hyporeflexie und schlaffe Muskelschwäche. Es zeigen sich Schluckstörungen sowie Entkräftung und Abmagerung. Dieses letzte Stadium dauert zwischen einem und zwei Monaten.

Kuru konnte bereits 1966 erfolgreich auf Schimpansen übertragen werden (Beck *et al.* 1966; Gajdusek *et al.* 1966). Weitere experimentelle Übertragungen zeigten Ähnlichkeiten von Kuru zur klassischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) im Gegensatz zur neuen Variante von CJD (vCJD) (Brown *et al.* 1994b; Wadsworth *et al.* 2008). Auch der fehlende Nachweis von PrPsc in lymphoretikulärem Gewebe bei Kuru zeigt eine deutliche Abgrenzung zu vCJD (Brandner *et al.* 2008; Collinge *et al.* 2008). Dies widerlegt die These, dass eine lymphoretikuläre Pathogenese in Zusammenhang mit dem exogenen Inokulationsweg steht, sondern eher eine Stamm-spezifische Eigenschaft darstellt (Brandner *et al.* 2008). Klinisch und neuropathologisch sind Kuru und die sporadische Form der CJD (sCJD) jedoch klar voneinander zu unterscheiden. Während bei Kuru Ataxie von Beginn an im Vordergrund steht und Demenz

nur vereinzelt und schwach ausgeprägt ist, zeigt sich bei sCJD Demenz als erstes und wichtiges Symptom. Neuropathologisch zeigen sich Ähnlichkeiten zwischen Kuru und sCJD, wobei Kuru definiert ist durch das Auftreten von besonders markanten weitverteilten PrP-Plaques, sogenannten „Kuru-type“-Plaques, die in Gehirnen von Patienten mit sCJD nur in 5-10% der Fälle auftreten (Brandner *et al.* 2008; Brown *et al.* 1994b; Hainfellner *et al.* 1997; McLean *et al.* 1998). Die Gemeinsamkeiten von iCJD mit Kuru bestehen in einer sehr langen Inkubationszeit (bis zu 25 Jahre) und einem vorwiegend zerebellären Syndrom (Brown *et al.* 1994b).

2.6.2 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Creutzfeldt Jakob Disease, CJD)

2.6.2.1 Klassische CJD

Die deutschen Neuropathologen Creutzfeldt und Jakob beschrieben in den 1920er Jahren unabhängig voneinander insgesamt sechs Fälle einer Erkrankung des zentralen Nervensystems beim Menschen (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Klatzo stellte die Verbindung zwischen CJD und Kuru her (Klatzo *et al.* 1959) und 1968 wurde erstmals die Übertragung von CJD auf Schimpansen nach intrazerebraler Inokulation berichtet (Gibbs, Jr. *et al.* 1968).

Bei der klassischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) unterscheidet man zwischen sporadischer, familiärer und iatrogener CJD. Die weltweite Häufigkeit von CJD liegt bei einem Fall pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Die sporadische Form (sCJD) tritt dabei mit 85 bis 90% der Fälle am häufigsten auf. Die familiäre CJD (fCJD) tritt in etwa 10 bis 15% der Fälle auf (Lasmezas 2003). Sie wird autosomal dominant vererbt und zeigt eine Mutation im *PRNP*-Gen. Eine iatrogene Übertragung (iCJD) (< 1%) wurde durch Corneatransplantate, Dura-Mater-Transplantation und über chirurgische Bestecke sowie nach Verabreichung von kontaminierten Wachstumshormonen aus menschlichen Hypophysen nachgewiesen (Brown *et al.* 1992; Brown *et al.* 1994a; Will 2003).

An CJD erkrankte Personen sind durchschnittlich 65 Jahre alt. Die Inkubationszeit beträgt Jahrzehnte und die Patienten sterben ca. zwei bis acht Monate nach Auftreten der ersten Symptome. Die am häufigsten gestellte Differentialdiagnose ist die Alzheimer-Krankheit (Heinemann *et al.* 2007), die die häufigste Ursache für Demenz bei älteren Menschen ist.

Die klassische CJD ist gekennzeichnet durch schnelle progressive Demenz, wobei in 10% der Fälle zu Beginn Verhaltensstörungen und Persönlichkeitsänderungen auftreten (Will and Zeidler 1996). Zudem kommt es zu zerebellären Ataxien und visuellen Störungen sowie pyramidalen bzw. extrapyramidalen Dysfunktionen. Neuropathologisch treten Läsionen im Bereich des Neocortex, Thalamus und im Cerebellum auf, wobei der Grad der Veränderungen

von Patient zu Patient unterschiedlich ist (Brown *et al.* 1994b). Bei sCJD treten die sogenannten „Kuru-type“-Plaques nur in 5-10% der Fälle auf. Die familiäre Form unterscheidet sich von der sCJD durch ein früheres Einsetzen und ein längeres Andauern der Erkrankung sowie dem Nachweis von amyloiden Plaques in allen Fällen. Bei iatrogener CJD steht im Gegensatz zu den beiden anderen Formen zu Beginn der Erkrankung Ataxie im Vordergrund (Brown *et al.* 1994b). Im Gegensatz zu vCJD sind bei klassischer CJD keine sogenannten floriden Plaques, die aufgrund ihres fädigen bzw. strähnigen Aussehens und daher ihrer Ähnlichkeit zu Blumenblüten so genannt werden, nachweisbar.

Bei sCJD sind zwei Glykosylierungsmuster bekannt (Typ 1 und 2). Bei Typ 1 bleibt nach Proteinase K-Verdau ein Protein von 21 kDa, bei Typ 2 von 19 kDa. Typ 1 tritt bei der Mehrheit der sCJD-Patienten auf; sie sind homozygot für Methionin (M/M) im Codon 129 des *PRNP*-Gens. Typ 2 kommt seltener und bei allen Genotypen vor (M/M, M/V, V/V) (Parchi *et al.* 1996).

Auch bei CJD ist PrPres in peripheren Geweben nachweisbar. Glatzel und Mitarbeiter konnten dies 2003 erstmals in Muskulatur und Milz von sCJD-Patienten nachweisen (Glatzel *et al.* 2003). Dies wurde durch eine weitere Arbeit bestätigt, in der PrPres in muskuloskelettalen Nervenfasern, jedoch nicht in der Herzmuskulatur von Patienten mit sCJD, iCJD und vCJD, nachgewiesen werden konnte (Peden *et al.* 2006).

Zusätzlich wird bei Verdacht auf CJD die Cerebrospinalflüssigkeit untersucht. Es lassen sich zwei Proteine als Marker für sCJD identifizieren (Harrington *et al.* 1986; Zerr *et al.* 1996), die der Familie der 14-3-3-Proteine zugeordnet werden konnten (Hsich *et al.* 1996). Der Nachweis hat eine Sensitivität zwischen 90 und 97% und eine Spezifität von 87 bis 100% für die Diagnose von sCJD (Collins *et al.* 2000; Van Everbroeck B. *et al.* 2004).

2.6.2.2 Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (variant Creutzfeldt Jakob Disease, vCJD)

Im April 1996 wurde in Großbritannien erstmals eine neue Variante der CJD (vCJD) bei 10 Patienten beschrieben (Will *et al.* 1996). Sie unterscheidet sich durch verschiedene Besonderheiten von der klassischen CJD: 1. Die Patienten sind überwiegend unter 40 Jahre alt (Durchschnittsalter: 27 Jahre), während bei der klassischen CJD weniger als 1% der Patienten so jung erkranken, 2. Klinisch stehen bei vCJD Verhaltensänderungen, Dysästhesie und Ataxie im Vordergrund, während bei der klassischen Form zu Beginn vor allem fortschreitende Demenz gesehen wird, 3. Ein verlängerter Krankheitsverlauf (7,5 bis 22,5 Monate) und 4. Ein charakteristisches neuropathologisches Bild mit Nachweis von Amyloid-Plaques. Diese

Plaques sind ultrastrukturell klar abgrenzbar zu den unizentrischen Plaques bei Kuru und sCJD sowie zu den multizentrischen Plaques wie sie bei dem Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS) auftreten (Sikorska *et al.* 2009). Der Nachweis von hoher Infektiosität in lymphoretikulärem Gewebe wie Milz, Peyerschen Platten und Lymphknoten, vor allem aber in den Tonsillen (Glatzel *et al.* 2003; Hill *et al.* 1999; Wadsworth *et al.* 2001) ist weiterhin charakteristisch für vCJD. Daher dient die Tonsillenbiopsie unter anderem zur frühzeitigen Diagnose von vCJD. Zudem scheinen Darm-assoziierte sympathische Nerven bei der zentripetalen Ausbreitung von vCJD-Prionen nach oraler Aufnahme eine Rolle zu spielen. PrPres konnte im Ganglion stellatum und in den Ganglia coeliaca von vCJD-Patienten, nicht aber von sCJD-Patienten nachgewiesen werden (Haik *et al.* 2003). vCJD ist außerdem durch ein abweichendes Glykopprofil deutlich von sCJD unterscheidbar (Collinge *et al.* 1996).

Die ausgeprägte periphere Pathogenese bei vCJD sowie das Auftreten von subklinischen Verläufen von Prionen-Erkrankungen, zumindest in verschiedenen Tiermodellen (Hill and Collinge 2003; Thackray *et al.* 2002), stellen ein Problem bezüglich der iatrogenen Übertragung bei Operationen von asymptomatischen Patienten dar. Es sind außerdem Fälle von vCJD nach Bluttransfusion bekannt geworden (Llewelyn *et al.* 2004; Peden *et al.* 2004; Wroe *et al.* 2006). Bisher sind noch keine effektiv wirksamen Behandlungsmethoden verfügbar, wenn auch Medikamente wie z.B. Quinacrine, Pentosan Polysulfat und Flupirtine zur Behandlung von TSE untersucht werden (Knight 2009). Eine neue Klasse von Inhibitoren stellen die Diphenylpyrazole dar, die vielversprechende Ergebnisse in Zellkultur-Experimenten und im Mausmodell lieferten (Geissen *et al.* 2011; Leidel *et al.* 2011).

Zwei wesentliche epidemiologische Aspekte führten zu der Annahme, dass BSE möglicherweise für diese neue Form der CJD verantwortlich ist: Der zeitliche Zusammenhang des erstmaligen Auftretens beider Erkrankungen und die Tatsache, dass beide TSE zunächst nur in Großbritannien auftraten. Vermutet wird eine orale Infektion mit BSE-kontaminierten Fleischprodukten. Einen möglichen Zusammenhang zwischen BSE und vCJD ergaben auch die Untersuchungen von Collinge und Mitarbeitern, die zeigten, dass BSE und vCJD ähnliche Glykosylierungsmuster aufweisen (Collinge *et al.* 1996). Ein weiterer Hinweis ergab sich bei der Übertragung von BSE auf Rhesusaffen. Nach intrazerebraler Inokulation entwickelten die Tiere nach einer Inkubationszeit von 3 Jahren eine Krankheit, die sowohl klinisch als auch histopathologisch der vCJD ähnelte (Lasmézas *et al.* 1996). Weitere Untersuchungen bestätigten die vorangegangenen Resultate. Auch oral konnte BSE auf Primaten übertragen werden und es zeigten sich charakteristische Veränderungen von vCJD (Herzog *et al.* 2004; Lasmézas

et al. 2005). Dennoch bleibt es problematisch, die tatsächliche Exposition von Menschen für BSE mit Studien in einem Tiermodell zu vergleichen (Head and Ironside 2005).

Ein weiteres Merkmal von vCJD scheint ein genetischer Hintergrund zu sein: Alle bisher getesteten erkrankten Patienten waren homozygot für Methionin im Codon 129 des *PRNP*-Gens (Collinge *et al.* 1996; Will 2002).

Insgesamt traten weltweit bisher 222 Fälle auf, von denen drei sekundäre Fälle auf eine Übertragung von Blut zurückgeführt werden (The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit; <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>). Die mit Abstand höchste Zahl der Erkrankungen liegt mit 173 Fällen (Stand Oktober 2011) jedoch weiterhin in Großbritannien (Anonym 2011c). In Deutschland ist bisher kein Fall von vCJD bekannt.

2.6.3 Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS)

Das Gerstmann-Sträussler-Syndrom (GSS) ist eine familiär auftretende TSE, die autosomal dominant vererbt wird und mit Mutationen auf dem Prion-Gen assoziiert ist. Sie wurde erstmals in Österreich beschrieben (Gerstmann 1928; Gerstmann *et al.* 1936; Sikorska *et al.* 2009). Die Erkrankung tritt überwiegend in einem Alter zwischen 50 und 60 Jahren, selten auch ab 25 Jahren, auf und kann zwischen 3 Monaten und 13 Jahren andauern (Brown *et al.* 1991; Collins *et al.* 2001). Klinisch zeigen sich Demenz sowie zerebelläre Ataxie und Haltungsabnormalitäten. Desweiteren entwickeln sich Beeinträchtigungen beim Gehen und Stehen sowie ein fortschreitender geistiger Verfall. Typisches neuropathologisches Merkmal sind weitverbreitet auftretende, multizentrische Plaques im ZNS (Collins *et al.* 2001; Sikorska *et al.* 2009).

2.6.4 Fatale Familiäre Insomnie (FFI)

Die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) trat erstmals 1986 auf und betraf fünf Mitglieder einer italienischen Großfamilie (Lugaresi *et al.* 1986; Tateishi *et al.* 1995). Die FFI wurde jedoch erst später als neue, genetisch bedingte Erkrankung erkannt und mit dem Nachweis von PrPres und erfolgreicher experimenteller Übertragung auf Labortiere den TSE zugeordnet (Medori *et al.* 1992; Tateishi *et al.* 1995). FFI kann auch sporadisch auftreten (Mastrianni *et al.* 1999). Der Beginn der Symptome variiert zwischen einem Alter von 20 und 63 Jahren und dauert zwischen 6 bis 42 Monaten an. Markantes Symptom der FFI ist eine schwerwiegende Störung des normalen Schlaf-Wach-Zyklus (Collins *et al.* 2001). Typischerweise zeigen sich histopathologisch die stärksten Veränderungen im Bereich des Thalamus und PrPres ist insgesamt relativ schwach nachweisbar (Collins *et al.* 2001).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Für alle Ansätze wurde das Wasser aus der hauseigenen Deionisierungsanlage verwendet. Es wird im Folgenden als Aqua bidest. (A. bidest.) bezeichnet.

3.1.1.1 Puffer und Lösungen für die Histologie/Immunhistochemie

Eosin-Vorratslösung

5% Eosin Y in A.bidest

Eosin-Färbelösung

1:10 Verdünnung der Eosin-Vorratslösung in 50% Ethanol und Zugabe von 1 Tropfen Eisessig pro 100 ml, vor Gebrauch filtrieren

PBS-A 10x

NaCL	80,00 g
KCl	2,00 g
Na-hydrogenphosphat-Dihydrat	11,50 g
K-dihydrogenphosphat	2,00 g
Aqua bidest.	ad 1,00 L

Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)

Lysin-HCl	6,85 g
Na-meta-perjodat	1,07 g
Formalin 10%	200,00 ml
PBS-A 10x	50,00 ml
Aqua bidest.	ad 500,00 ml
pH 7,0 mit NaOH einstellen	

TBS-T 10x

Tris	60,55 g
NaCl	85,00 g
Tween 20	5,00 ml
A. bidest	ad 1000,00 ml
pH 7,6 mit 37% HCl einstellen	

Wasserstoffperoxid 1%

Wasserstoffperoxid 30%	7,00 ml
Aqua bidest.	ad 200,00 ml

Citrat-Puffer

Vorratslösung A:

Citronensäure 0,10 M

Vorratslösung B:

Na-Citrat-dihydrat 0,10 M

Gebrauchslösung:

Vorratslösung A 18,00 ml

Vorratslösung B 82,00 ml

Aqua bidest. ad 1000,00 ml

pH 6,0

PK-Puffer 10x

Tris 30,28 g

EDTA 1,46 g

Tween 20 5,00 ml

A. bidest ad 500,00 ml

pH 8,3 mit 37% HCl einstellen

3.1.1.2 Puffer und Lösungen für proteinanalytische MethodenTAE 10x

Tris 121,00 g

Na-acetat 68,00 g

EDTA 18,00 g

A. bidest ad 10,00 L

pH 7,8 mit 96% Essigsäure einstellen

EP-Puffer 5x

SDS 25,00 g

Tris 150,00 g

Glycin 720,00 g

A. bidest ad 5,00 L

pH 8,3

Bromphenolblau 6x

Bromphenolblau 0,25 g

Xylencyanol 0,25 g

Glycerin 30,00 ml

10x TAE 50,00 ml

A. bidest. ad 100,00 ml

Sucrose

Sucrose 0,32 M
in A. bidest lösen und steril filtrieren

Tris/HCl 1M

Tris 121,10 g
A. bidest. ad 1000,00 ml
pH 7,5 bis 8,0 mit 37% HCl einstellen

PK-Puffer 10x

Tris/HCl 1M pH 7,8 1,00 ml
20% SDS 2,50 ml
CaCl₂ 2M 0,05 ml
Aqua bidest. ad 10,00 ml
Kurz bei 60°C erwärmen

NaPTA

Phosphorwolframsäure 0,40 g
170 mM MgCl₂ 9,00 ml
auf Magnetprüher lösen und 10 Tropfen 5 M NaOH zugeben

Complete Mini

1 Tablette in 1,5 ml A. bidest. lösen

Untergel-Lösung

Rotiphorese Gel A-Lösung 166,50 ml
Rotiphorese Gel B-Lösung 39,90 ml

Obergel-Lösung

Rotiphorese Gel A-Lösung 66,00 ml
Rotiphorese Gel B-Lösung 10,00 ml

Resolving Puffer

Tris 72,60 g
HCl 37% 96,00 ml
A. bidest. ad 200,00 ml

Spacer Puffer

Tris 7,20 g
A. bidest ad 100,00 ml
pH 6,7

Rezeptur für das Trenngel:

Untergel-Lösung	5,20 ml
Resolving Puffer	2,00 ml
10% SDS	0,10 ml
Harnstoff 8 M	3,00 ml
APS (33 mg/ml)	0,225 ml
TEMED	0,020 ml

Rezeptur für das Sammelgel:

Obergel-Lösung	1,20 ml
Spacer Puffer	0,50 ml
10% SDS	0,05 ml
Harnstoff 8 M	3,00 ml
APS (33 mg/ml)	0,15 ml
TEMED	0,01 ml

Ladepuffer

Bromphenolblau 6x	450,00 µl
Roti-Load 4x	50,00 µl

Semi-Dry-Blot-Puffer

Tris	5,80 g
Glycin	2,90 g
SDS	0,37 g
Methanol	200,00 ml
A. bidest	ad 1000,00 ml

3.1.1.3 Puffer und Lösungen für RNA/DNA**RNA**DEPC-H₂O

0,1% Diethylpyrocarbonat in Aqua bidest. über Nacht rühren lassen, dann autoklavieren

MOPS/EDTA 10x

MOPS	0,20 M
Natriumacetat	50,00 mM
EDTA	10,00 mM

pH 7,0 mit Eisessig einstellen und autoklavieren

Laufpuffer

1x MOPS/EDTA in DEPC-H₂O

Formamid-Dye

Bromphenolblau	0,10 %
Xylencyanol	0,10 %
EDTA	10,00 mM
Die Lösung wird in deionisiertem Formamid gelagert	

FALD

10x MOPS/EDTA	200,00 µl
Formamid deionisiert	1,00 ml
Formaldehyd (37%)	354,00 µl
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	5,00 µl
Formamid-Dye	100,00 µl

RNA Secure 2x

RNA Secure Reagent 25x	10,00 µl
H2O RNase free	115,00 µl

SSC 20x

NaCl	3,00 M
Natriumcitrat	0,30 M

Agarosegel 1,0%

Agarose	1,00 g
DEPC-H2O	87,00 ml
MOPS/EDTA	10,00 ml
Formaldehyd (37%)	3,00 ml

TE-Puffer

Tris	10,00 mM
EDTA	1,00 mM
pH 7,4	

DNAEP-Puffer 50x

Tris	242,30 g
Na-acetat	34,00 g
EDTA	18,60 g
A. bidest.	ad 1,00 L
pH 7,8 mit 37% Essigsäure einstellen und autoklavieren	

Metaphorgel 2,5%

Metaphor-Agarose	2,50 g
------------------	--------

1x EP-Puffer	100,00 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	3,00 µl

Laufpuffer

1x EP-Puffer	900,00 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	27,00 µl

BSE

Sucrose	50,00 %
EDTA pH 8,0	50,00 mM
SDS	0,50 %
Bromphenolblau	0,06 %

3.1.2 Antikörper

Name	Firma
GFAP	Dako
Goat-anti-mouse IgG HRP: sc-2005	Santa Cruz
HRP-conjugated anti-biotin antibody	Cell Signaling
POM1	Prof. A. Aguzzi Institut für Neuropathologie, Universität Zürich (Donofrio <i>et al.</i> 2005)
SAF84	Cayman

3.1.3 Marker

Name	Firma
Broad Range Marker: sc-2361	Santa Cruz
HyperLadder IV und V	Bioline
RNA Marker 0.28-6.6 KB R 7644	Sigma

3.1.4 Enzyme

Name	Firma
Benzonase	Novagen
EcoRI 101CL	New England BioLabs
Proteinase K	Roche
Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)	Qiagen

3.1.5 Kits

Name	Firma
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
Protein-Assay	Bio-Rad
Rediprime™ II	
Random Prime Labelling System	GE Healthcare
SuperPicTure™ HRP Polymer	
Broad Spectrum (DAB)	Zymed
TSA™ Biotin System	Perkin Elmer
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz

3.1.6 Chemikalien

Name	Firma
Acrylamid	Serva
Agarose	Life Technologies
Ameisensäure 98-100%	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau Na-Salz	Serva
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Citronensäure	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva
Entellan	Merck
Entwicklerlösung für Röntgenfilme Roentoroll HK	Tetenal
Eosin Y	Sigma
Essigsäure 37%	Roth
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol	Roth
Ether	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz (EDTA)	Serva
Fixierlösung für Röntgenfilme Superfix LR	Tetenal

Formaldehyd 37%	Merck
Formamid deionisiert	Invitrogen
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hämatoxylin nach Gill II	Roth
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LMP Agarose	Life Technologies
Lysin-HCl	Sigma
Magermilchpulver	Neuform
Magnesiumchlorid	Merck
Metaphor-Agarose	FMC BioProducts
Methanol	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat-dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Natrium-meta-perjodat	Fluka
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck
Paraplast X-TRA	Mc Cormick Scientific
Phosphorwolframsäure	Sigma
RNAlater	Ambion
RNA Secure Reagent	Ambion
RNase Zap	Ambion
Roti-Histofix 10%	Roth
RotiHistol	Roth
Roti Liquid Barrier	Roth
RotiLoad 4x	Roth
Rotiphorese Gel A	Roth
Rotiphorese Gel B	Roth

Salzsäure 37%	Roth
Sarkosyl (N-lauroylsarcosine)	Sigma-Aldrich
Sucrose	Serva
Target Retrieval Solution (TRS) 10x	Dako
TEMED	Roth
THE RNA Storage Solution	Ambion
Tissue Embedding Medium GSV1	Slee Technik GmbH
Tris Ultra Pure	Invitrogen
TriZOL	Invitrogen
Tween 20	Serva
ULTRAhyb TM Solution	Ambion
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Western Blotting Luminol Reagent sc-2048	Santa Cruz
Xylencyanol	Roth

3.1.7 Geräte und Laborhilfsmittel

Name	Firma
Anschlagkanülen Micro-Fine TM + Demi (0,3 ml)	Becton Dickinson
Autotechnikon Duo Mod. 2a	Technikon Corporation
Bechergläser, verschiedene Größen	Schott
BioPhotometer	Eppendorf
Blotkammer Semi-Dry	Sigma-Aldrich
Dampfdrucktopf Sicomatic	Silit
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel
Digitale Fotokammer TFX-35 LM	Vilber Lourmat
Digitalkamera DC120 Zoom	Kodak
Einbettautomat TP 1020	Leica
Einbettkassetten	Roth
Einmal-Küvetten	Plastikbrand
Einmalspritzen und Kanülen	Braun
Eismaschine AF 20	Scotsman
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
Erlenmeyerkolben	Schott
Feinwaage Analytic AC 210S	Sartorius

Feinwaage SM1000	Sauter
Folienschweißgerät	Joisten und Kettenbaum
Gelelektrophoresekkammer	Biometra
Gelelektrophoresekkammer Horizon TM58	Invitrogen - BRL
Gelelektrophoresekkammer Model H5	Invitrogen - BRL
Gelelektrophoresekkammer OWL	Angewandte Gentechnologie SystemeGmbH
Glasflaschen, verschiedene Größen	Schott
Glaspipetten, verschieden Größen	Scherf
Homogenisator Omni TH	Omni International
Hybond-N ⁺ Nylonmembran	GE Healthcare
Hybridisierungsflaschen	Schott
Hybridisierungsöfen Typ 30SonderHyb	Bachofer
illustra TM NICK TM Columns	
Sephadex TM G-50 DNA Grade	GE Healthcare
Isopropanol	Roth
Kamera für Mikroskop DC 300	Leica
Kochplatte	efbe-Schott
Magnetrührer	IKA Combimag
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner
Messzylinder	Schott
Mikropipetten, verstellbar	Eppendorf, Gilson
Mikroskop DM RBE	Leitz
Mikrotom RM 2145	Leica
Mikrowellenherd	Bosch
Objekträger Superfrost ^R Plus	Menzel-Gläser
[³² P] dCTP	MP Biomedicals
Parafilm	American National Can TM
Paraffin Section Mounting Bath	Electrothermal
PCR Softtubes (0,2 ml)	Biozym
pH-Meter CG 840	Schott
Photometer Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Greiner
Pipettierhilfe Accupetta	Ratiolab

Pipettierhilfe Acuboy	Tecnorama
PVDF Transfer Membran 0,45 µm	Millipore
Ribolyser:FastPrep FP120	Savant/Bio101
Röntgenfilme BioMax XAR	Kodak
Röntgenfilmkassette	AGFA
Röntgenverstärkerfolie	Perlux
Scanner 1640SU	Epson
Schredder-Röhrchen Lysin Matrix D	MP Biomaterials
Skalpellklingen, steril	Aesculap
Spannungsgerät 2301 Macrodrive 1	LKB Bromma
Spannungsgerät Model 200	Invitrogen - BRL
Spannungsgerät Model 200/2.0	Bio-Rad
Sterilfilter 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer 5436, 5437	Eppendorf
Thyphoon 9410	GE Healthcare
UV-Crosslinker Stratalinker™ 1800	Stratagene
Vakuumofen	Heraeus
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wärmeschränk	Memmert
Wasserbäder	Köttermann
Whatman-Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Wippe	Rockomat Tecnomara
Wippe	WS 5 Bühler
Zentrifuge 5415C, 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammen dem durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigten Tierversuchsantrag 35/9185.81-6/195.

Für die vergleichenden Studien wurden zur Beurteilung von Wildtyp-Mäusen Tiere der beiden Inzuchtlinien CD-1 und C57/Bl6 verwendet, die am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen gezüchtet wurden. Die transgenen tga20-Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Aguzzi vom Institut für Neuropathologie der Universität Zürich (Fischer *et al.* 1996) und am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen weiter gezüchtet.

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere für die Versuche verwendet. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 6 bis 8 Wochen alt und klinisch unauffällig. Alle Versuche wurden in den Isolierställen des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen durchgeführt. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal zehn Tieren pro Käfig nach Geschlecht getrennt unter Isolationsbedingungen gehalten. Die Stalltemperatur lag zwischen 20 und 25°C. Futter (Futterpellets) und Wasser standen den Tieren jederzeit ad libitum zur Verfügung.

3.2.2 Herstellung des Gehirnhomogenates und Berechnung des Infektiositätstiters

Das hier verwendete 1%ige bzw. 10%ige Gehirnhomogenat wurde aus einem 20%igen-Gehirnhomogenat-Ausgangsmaterial des maus-pathogenen Prion-Stammes Rocky Mountain Laboratory (RML) nach der sechsten Passage in CD-1-Mäusen hergestellt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A. Aguzzi vom Institut für Neuropathologie der Universität Zürich), bei -70°C gelagert und bei Bedarf in 0,32 M Sucrose verdünnt.

Gehirnhomogenat von gesunden CD-1-Mäusen wurde ebenfalls als 20%iges Ausgangshomogenat bei -70°C gelagert und mit 0,32 M Sucrose verdünnt.

Zur Berechnung des Infektiositätstiters wurde das lineare Verhältnis zwischen Infektiositätstiter und Inkubationszeit von $y = 11,45 - (0,088 \cdot x)$ zugrunde gelegt (Kaeser *et al.* 2001). Dabei ist y die log LD₅₀ und x die Inkubationszeit in Tagen.

3.2.3 Inokulation

Vor Beginn der Inokulation wurden alle Tiere klinisch untersucht. Es wurden ausschließlich klinisch unauffällige Tiere mit ungestörtem Allgemeinbefinden für die Versuche verwendet. Die Narkose erfolgte mit Ether. Ein Glasbehälter wurde mit in Ether getränkten Tüchern

ausgelegt und ein Stahlgitter darüber gesetzt. Jeweils ein Tier wurde in den Behälter verbracht und im Etherdampf betäubt. Nach Eintreten der Narkose wurde das Tier entnommen, am Kopf vorsichtig fixiert und es wurden 30 µl des 1%igen Gehirnhomogenates mit einer Anschlagkanüle intrazerebral injiziert. Die Kanüle wurde von dorsal nach ventral senkrecht zur Schädeldecke eingeführt. Paramedian zum Sulcus longitudinalis wurde das Inokulum in Bereiche des Zwischenhirns gespritzt. Für die intraperitoneale Inokulation wurden die Tiere im Genick fixiert und die Bauchdecke gestrafft. 100 µl des 1%igen Gehirnhomogenates wurden mit einer Kanüle leicht schräg durch die Bauchdecke in die Bauchhöhle injiziert. Für die orale Inokulation wurden 200 µl des 1%igen bzw. 10%igen Gehirnhomogenates verabreicht. Dazu wurden die Tiere im Genick fixiert und das Inokulat mit einer Knopfkanüle direkt in den Magen gegeben.

Um auszuschließen, dass die alleinige intrazerebrale Inokulation eines Gehirnhomogenates bei den verschiedenen Mausstämmen Veränderungen im Gehirn induziert, wurden nach ic-Inokulation als Kontrollen sowohl unbehandelte Tiere („Kontrollen“) als auch Mäuse, denen ein 1%iges Gehirnhomogenat von gesunden Mäusen verabreicht wurde („Kontrollen-1%“), untersucht. Für letztere wurden für die beiden Wildtyp-Mausstämme zu den beiden frühesten Zeitwerten und für die tga20-Mäuse für alle Stadien (klinische Stadien: Siehe Kapitel 3.2.5) je zwei Tiere mit 1%igem Gehirnhomogenat von nicht-behandelten, gesunden CD-1-Mäusen intrazerebral inokuliert.

3.2.4 Klinische Überwachung

Die Tiere wurden bis zum ersten Auftreten von Symptomen zweimal wöchentlich, danach täglich klinisch beurteilt. Dabei wurden der klinische Verlauf der Erkrankung sowie die klinischen Symptome bei den drei Mausstämmen nach den drei Inokulationswegen dokumentiert.

3.2.5 Probenentnahme

Der Verlauf der Erkrankung wurde in drei Stadien eingeteilt:

- präklinisches Stadium (klinisch unauffällige Tiere): drei Zeitwerte (1., 2. und 3. Zw.),
- frühes klinisches Stadium (Tiere, die erste Anzeichen von Scrapie aufwiesen) und
- spätes klinisches Stadium (Tiere mit ausgeprägten klinischen Symptomen für Scrapie).

Tiere im späten Stadium der Erkrankung wurden klinisch beurteilt und danach sofort getötet, um weiteres Leiden zu verhindern.

Zu jedem Zeitwert der Krankheitsstadien wurden wenn möglich von vier inokulierten Tieren und zwei gleichaltrigen unbehandelten Kontrolltieren bzw. von Mäusen, die mit Gehirnhomogenat von nicht behandelten, gesunden CD-1-Mäusen inokuliert wurden, Proben entnommen und zur Fixierung in Formalin bzw. RNAlater gegeben. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und dann sezirt. Zunächst wurde das Gehirn entnommen. Dazu wurde die Schädeldecke eröffnet und entfernt, um das Gehirn freizulegen. Mit einem kleinen Löffel wurde das Gehirn vorsichtig herausgehoben und auf ein kleines Wägeschälchen gelegt. Das Gehirn wurde mit einem Skalpell in der Fissura longitudinalis cerebri sagittal in zwei Hälften zerteilt. Eine Hälfte wurde in 4%iges Formalin bzw. in Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Fixativ (McLean and Nakane, 1974) gegeben. Die andere Hälfte wurde in RNAlater verbracht, für 24 Stunden bei 4°C gelagert und schließlich bei -70°C eingefroren. Danach wurde die Bauchhöhle und anschließend die Brusthöhle eröffnet und die verschiedenen Organe entnommen. Die Milz wurde ebenfalls geteilt und sowohl in 4%igem Formalin bzw. in Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Fixativ als auch in RNAlater fixiert. Zusätzlich zu Gehirn und Milz wurden Thymus, Herz, Lunge, Leber, Niere, Lymphonodi mesenteriales, Dünndarm, Dickdarm und Muskulatur entnommen und ebenfalls in 4%igem Formalin bzw. in Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Fixativ fixiert. Die Muskulatur wurde aus dem Bereich des Oberschenkels entnommen. Organe in Formalin bzw. in Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Fixativ wurden für mindestens 24 Stunden fixiert und dann zur Reduzierung der Infektiosität für 1 Stunde in 98-100%ige Ameisensäure (Taylor *et al.* 1997) verbracht. Nach Spülen mit Leitungswasser für 15 bis 30 Minuten wurden die Proben entweder nochmals in frisches 4%iges Formalin bzw. in Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd (PLP)-Fixativ für mindestens 48 Stunden verbracht oder direkt für die Einbettung (Kapitel 3.2.6.1) weiter verarbeitet.

Zusätzlich wurden Teile aller Organe für Untersuchungen an Gefrierschnitten zum dritten Zeitwert des präklinischen Stadiums und für das frühe und späte klinische Krankheitsstadium eingefroren. Für die Cryo-Fixierung wurden zu jedem Stadium möglichst drei inokulierte Mäuse und je zwei gleichaltrige unbehandelte Kontrolltiere getötet werden. Die Organproben wurden in Gewebekleber (Tissue Embedding Medium GSV1) auf Korkplättchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Mehrzweckgefäße mit Schnappdeckel verbracht und erneut in flüssigen Stickstoff gegeben bis zur endgültigen Lagerung bei -70°C.

3.2.6 Histologie und Immunhistochemie

3.2.6.1 Einbettung

Die Einbettung erfolgte in einem Automaten (Autotechnikon). Dabei wurden die Proben nach folgenden Zeiten in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend bei 60°C in flüssiges Paraffin (Paraplast) verbracht.

Ethanol	70%	1 h
Ethanol	70%	2 h
Ethanol	70%	2 h
Ethanol	96%	1 h
Ethanol	96%	2 h
Ethanol	100%	1 h
Ethanol	100%	2 h
Ethanol	100%	2 h
Rotihistol		2 h
Rotihistol		2 h
Paraplast		5 h
Paraplast		2 h oder länger

Nach Durchlaufen der Einbettung im Autotechnikon wurde das Gewebe nochmals über Nacht bei 60°C in frisches Paraplast verbracht und anschließend in Blöcke gegossen, die zum Aushärten einige Stunden bei 4°C gelagert wurden. Die fertigen Paraffin-Blöcke wurden bei 4°C gelagert.

3.2.6.2 Anfertigen von histologischen Schnitten

Die Schnitte wurde mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Dazu wurden die Blöcke eingespannt und das Paraffin bis zur Schnittebene abgetragen. Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden 4 bis 5 Mikrometer dicke Schnitte auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und zunächst auf einem Abtropfbrett bei Raumtemperatur getrocknet. Über Nacht wurden sie in einen 60°C-Wärmeschränk verbracht und anschließend bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

3.2.6.3 Deparaffinisierung

Bevor Färbungen bzw. immunhistochemische Protokolle an den Schnitten durchgeführt werden konnten, mussten diese entparaffinisiert werden. Dies geschah durch eine absteigende Alkoholreihe. Als Übergangsmedium wurde, wie zuvor im Einbett-Automaten, Rotihistol verwendet.

Rotihistol		5 min
Rotihistol		5 min
Ethanol	100%	3 min
Ethanol	100%	3 min
Ethanol	96%	3 min
Ethanol	70%	3 min
Ethanol	50%	3 min

Anschließend wurden die Schnitte in Aqua bidest. verbracht und nach den verschiedenen Protokollen weiter inkubiert.

3.2.6.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Nach Deparaffinisierung der Schnitte wurden diese für 10 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung gestellt und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgte eine zweiminütige Inkubation in 50%igem Ethanol mit anschließender Färbung in Eosin-Färbelösung für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte für 1 Minute in 80%iges Ethanol verbracht. Es folgte die Entwässerung, die in diesem Fall bei 96%igem Ethanol begonnen wurde, und das Eindecken mit Entellan (Kapitel 3.2.6.6).

3.2.6.5 Immunhistochemie

Zwischen den verschiedenen Behandlungsschritten der Protokolle wurde jeweils vor dem Einkreisen der Schnitte PBS-A und danach TBS-T als Waschpuffer verwendet.

3.2.6.5.1 Nachweis des Glial Acidic Fibrillary Protein (GFAP)

Nach Deparaffinisierung der Schnitte wurden diese in einer einfach angesetzten Target Retrieval Solution (TRS) für 30 Minuten bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Dafür wurde TRS 10x mit Aqua bidest. 1:10 verdünnt und vorgewärmt. Danach wurden die Schnitte zum Abkühlen bei Raumtemperatur für weitere 20 min in TRS belassen und in PBS-A gewaschen. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen in einer 1%igen Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 Minuten. Nach Waschen wurden die Schnitte mit Roti-Liquid-Barrier eingekreist. Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper GFAP in einer Verdünnung von 1:2000 in 1%-Magermilch-TBS-T für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Als Zweitantikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase- (Horseradish-Peroxidase, HRP)-Konjugat (SuperPicTure™ HRP Polymer von Zymed). Dieses wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Die Bindung wurde mit Diaminobenzidin (DAB; SuperPicTure™ Kit von Zymed) markiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt (10 Sekunden in

Hämatoxylin-Lösung und anschließendes Bläuen für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser), durch die aufsteigende Alkoholreihe gezogen und mit Entellan eingedeckt.

3.2.6.5.2 Nachweis von PrPsc

Für die immunhistochemische Darstellung von PrPsc wurde in dieser Arbeit ein Protokoll neu etabliert. Der Nachweis des pathologischen Prion-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper SAF84 (Cayman). Für den immunhistochemischen Nachweis von PrPsc sind bekannterweise aufwendige Vorbehandlungen nötig. In diesem, eigenständig etablierten Protokoll wurden drei Vorbehandlungen angewendet. Zunächst wurden die Schnitte für 6 Minuten in 98-100%iger Ameisensäure inkubiert und danach gründlich gewaschen. Es folgte die Inkubation in Citrat-Puffer im Dampfkochtopf bei 121°C für ca. 15 Minuten. Nach Abkühlen und Waschen der Schnitte in PBS-A, Blocken der endogenen Peroxidasen mit 1%iger Wasserstoffperoxid-Lösung und Einkreisen der Schnitte mit Roti-Liquid-Barrier, folgte die Proteinase K (PK)-Behandlung. Dazu wurden die Schnitte zunächst in vorgewärmtem 1x PK-Puffer gespült und dann in einer vorgewärmten Lösung mit 4 µg/ml Proteinase K in 1x PK-Puffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Verstärkung der Markierung wurde bei diesem Protokoll das Tyramide Signal Amplification Biotin System von Perkin Elmer eingesetzt (Abb. 6). Mit dem TNB Blocking Buffer aus diesem Kit wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur unspezifische Bindungsstellen geblockt. Anschließend wurde der Erstantikörper SAF84 in einer Verdünnung von 1:10 000 in TNB angesetzt und für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase-(Horseradish-Peroxidase, HRP)-Konjugat (SuperPicTure™ HRP Polymer von Zymed). Nach erneutem Blocken mit TNB für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte nun die Verstärkung des Signals durch die Zugabe von Biotinyl Tyramide (Amplification Reagent) aus dem Tyramide Signal Amplification Biotin System, das 1:50 in Amplification Diluent (Tyramide Signal Amplification Biotin System) verdünnt und für 4 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen wurde. Nach anschließender Inkubation von Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (SA-HRP; Tyramide Signal Amplification Biotin System) in einer Verdünnung von 1:200 in TNB für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurde Diaminobenzidin (DAB; SuperPicTure™ Kit von Zymed) zugegeben. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest. abgestoppt und es folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe und Eindecken der Schnitte mit Entellan.

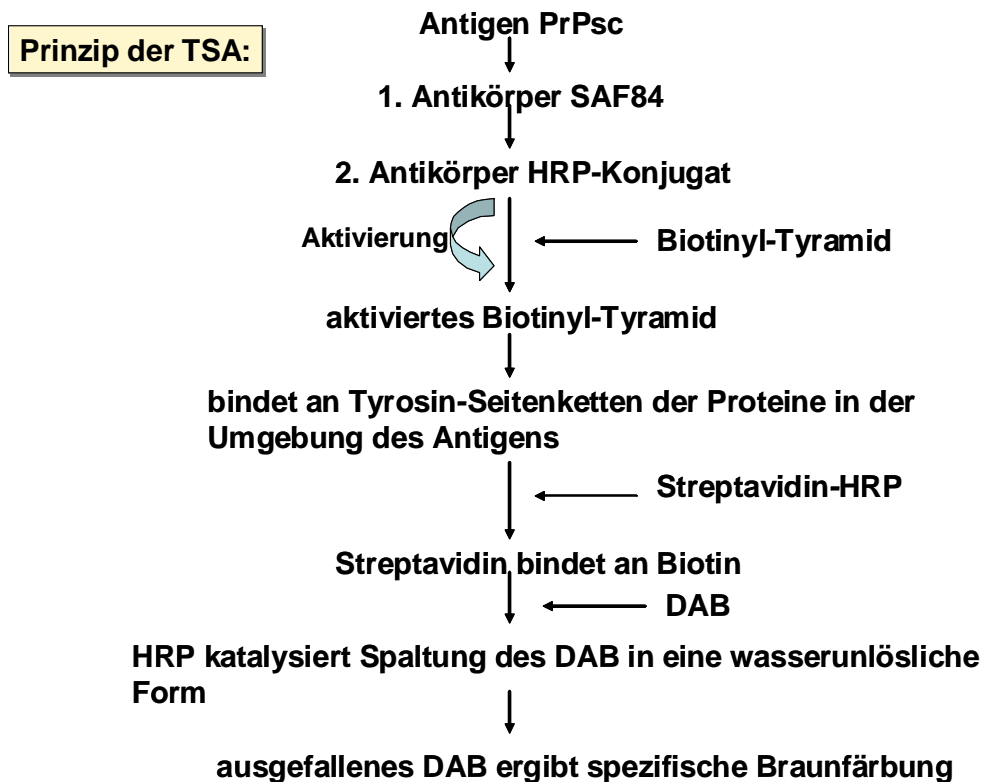


Abbildung 6: Prinzip des Tyramide Signal Amplification (TSA) Biotin Systems.

3.2.6.6 Entwässerung und Eindecken

Nach den verschiedenen Färbe- bzw. immunhistochemischen Protokollen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert.

Ethanol	50%	3 min
Ethanol	70%	3 min
Ethanol	96%	3 min
Ethanol	100%	3 min
Ethanol	100%	3 min
Rotihistol		5 min
Rotihistol		5 min

Danach wurden die Schnitte unter dem Abzug mit Entellan eingedeckt und zum Trocknen für einige Stunden oder über Nacht dort belassen.

3.2.6.7 Beurteilung der Vakuolisierung

In dieser Arbeit wurde zur Beurteilung der Vakuolisierung ein eigenes Schema entworfen. Die Auswertung erfolgte nach HE-Färbung am Sagittalschnitt der Gehirnhälften. Ähnlich wie bei Zhang *et al.* (2004), wurden am Sagittalschnittbild des Gehirns drei große Bereiche beurteilt (Abb. 7):

1. Kleinhirn (Cerebellum, Cb),

2. Hirnstamm (Hs) sowie

3. Cerebrum (Ce) und Dienzephalon (Di) mit Cortex (Cx), Hippocampus (Hc), Corpus striatum (Cs) und Thalamus (Th) und Hypothalamus (HTh).

Zur übersichtlicheren Darstellung werden im Folgenden die untersuchten Regionen des Cerebrums und Dienzephalons unter der Bezeichnung „Cerebrum/Dienzephalon“ (Ce/Di) zusammengefasst.

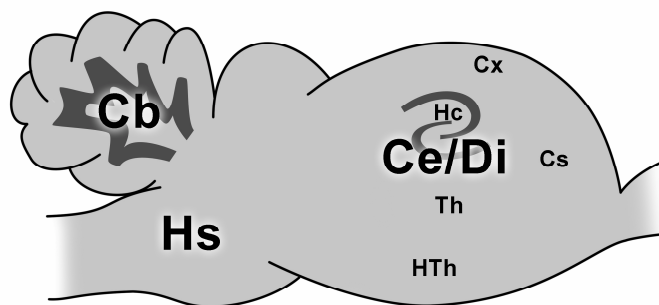


Abbildung 7: Schema eines Sagittalschnitts durch das Gehirn einer Maus.

Cb = Cerebellum; **Hs** = Hirnstamm; **Ce/Di** = Cerebrum und Dienzephalon mit Cortex (Cx), Hippocampus (Hc), Corpus striatum (Cs), Thalamus (Th) und Hypothalamus (HTh).

Die Vakuolisierung wurde nach folgendem Schema beurteilt (Abb. 8):

n.a. = nicht auswertbar

* = begrenzt auswertbar, Gewebeschnitt in diesem Bereich nicht vollständig erhalten

+/- = fraglich

-- = negativ, keine TSE-spezifischen Vakuolen nachweisbar

+ = Vakuolisierungsgrad 1 = einzelne, kleine TSE-spezifische Vakuolen, geringgradige Vakuolisierung (Abb. 8 A)

++ = Vakuolisierungsgrad 2 = zahlreiche, kleine TSE-spezifische Vakuolen bzw. einzelne größere Vakuolen, gering- bis mittelgradige Vakuolisierung (Abb. 8 B)

+++ = Vakuolisierungsgrad 3 = zahlreiche größere TSE-spezifische Vakuolen, mittelgradige Vakuolisierung (Abb. 8 C)

++++ = Vakuolisierungsgrad 4 = zahlreiche sehr große TSE-spezifische Vakuolen, die zum Teil ineinander übergehen, hochgradige Vakuolisierung (Abb. 8 D)

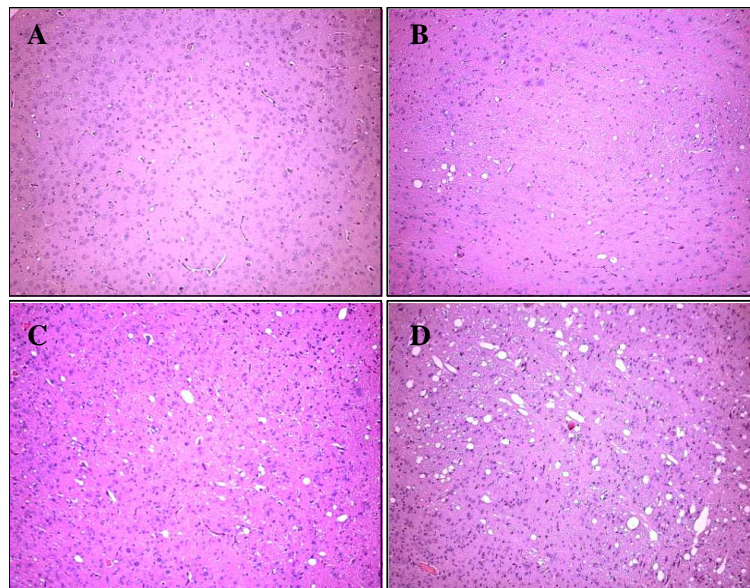


Abbildung 8: Vakuolisierungsgrade: A: Grad 1 (+): Geringgradige Vakuolisierung. B: Grad 2 (++) : Gering- bis mittelgradige Vakuolisierung. C: Grad 3 (+++) : Mittelgradige Vakuolisierung. D: Grad 4 (++++): Hochgradige Vakuolisierung (HE-Färbung, Vergrößerung: 10x).

3.2.6.8 Beurteilung der Astrozytose

Die Beurteilung der Astrozytose erfolgte ebenfalls am Sagittalschnitt der Gehirne. Eine krankhafte Vermehrung der Astrozyten wird als Astrozytose bezeichnet. Sie zeigt sich in einer Erhöhung der Zellzahl und in einer Größenzunahme der einzelnen Astrozyten. Als Marker für Astrozyten dient der Nachweis des Intermediärfilamentes Glial Acidic Fibrillary Protein (GFAP). Die Astrozyten wurden immunhistochemisch mit einem Primärantikörper gegen GFAP markiert (siehe 3.2.6.5.1). Die gefärbten Astrozyten wurden in vier repräsentativen Lokalisationen im Bereich des Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm bzw. Cortex pro Gehirnschnitt ausgezählt und der Mittelwert 1 (Mw 1) aus den vier Regionen für jedes Tier berechnet. Aus den einzelnen Mittelwerten pro Tier (Mw 1) wurde zusätzlich ein zweiter Mittelwert (Mw 2) für jede Tiergruppe pro Zeitwert bzw. Stadium berechnet.

3.2.6.9 Beurteilung der PrPsc-Ablagerungen

Die Auswertung erfolgte wie zuvor am Sagittalschnitt der Gehirne. Wie in 3.2.6.7 beschrieben, wurden drei große Regionen des Gehirns beurteilt. Der Nachweis von PrPsc wurde nach folgendem Schema ausgewertet (Abb. 9):

n.a. = nicht auswertbar

* = begrenzt auswertbar, Gewebeschnitt in diesem Bereich nicht vollständig erhalten

+/- = fraglich

- = negativ, keine PrPsc-spezifischen Ablagerungen nachweisbar (Abb. 9 A)
- + = geringgradiger Nachweis von PrPsc; einzelne feingranuläre Ablagerungen, teilweise in kleinen einzelnen Gruppen liegend; nur in einer Lokalisation der entsprechenden Region (Abb. 9 B)
- ++ = mittelgradiger Nachweis von PrPsc; feingranuläre Ablagerungen, die diffus über die gesamte Region verteilt sind oder in mehreren kleinen Gruppen in mehreren Lokalisationen der entsprechenden Region liegen (Abb. 9 C)
- +++ = hochgradiger Nachweis von PrPsc; feingranuläre Ablagerungen, die dicht über die gesamte Region verteilt sind; keine Gruppen mehr erkennbar (Abb. 9 D).

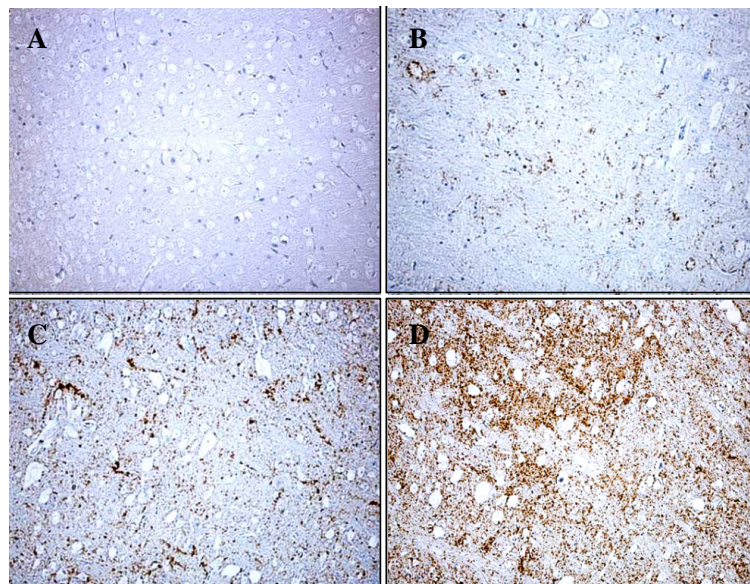


Abbildung 9: Schema zur Beurteilung der PrPsc-Akkumulation: A: Keine PrPsc-spezifischen Anlagerungen nachweisbar (--). B: Geringgradiger Nachweis von PrPsc (+). C: Mittelgradiger Nachweis von PrPsc (++). D: hochgradiger Nachweis von PrPsc (+++).

3.2.7 Proteinbiochemische Methoden

3.2.7.1 Herstellung der Homogenate

Von den in RNAlater fixierten Gehirnhälften wurde jeweils ein kleines, kraniales, in wenigen Fällen kaudales (Tab. 1) Stück entnommen und mehrmals in eiskaltem PBS-A gewaschen. Danach wurden 100 mg des Gehirns mit 900 µl 0,32 M Sucrose in ein Schredder-Röhrchen gegeben, einige Minuten auf Eis gekühlt und im Ribolyser auf Stufe 6 zweimal für 20 Sekunden homogenisiert. Danach wurden die 10%igen Homogenate in ein Eppli überführt und bei -20°C gelagert.

Inokulation	Mausstamm		
	CD-1	C57/Bl6	tga20
ic			
		61 - Tier 2	12 - Tier 4
		93 - Tier 1	40 - Tier 2
		97 - Tier 2	48 - Tier 2
		157 - Tier 2	61 - Tier 3
			64 - Tier 4
ip			
	168 - Tier 1		62 - Tier 3
	168 - Tier 1		76 - Tier 1
	175 - Tier 2		76 - Tier 2
	188 - Tier 1	195 - Tier 1	80 - Tier 1
oral			
		517 - Tier 1	

Tabelle 1: Einzelne Proben, die für die Western Blot Analyse aus dem kaudalen Gehirnbereich Kleinhirn/ Medulla oblongata entnommen wurden. . Zuordnung der Tiere: Siehe Kapitel 4.1, Tabellen 3, 5 und 7.

3.2.7.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde der „Protein Assay“ von Bio-Rad verwendet. Hierbei wurden die 10%igen Gehirnhomogenate 1:10 in 0,32 M Sucrose verdünnt und 8 µl des dann 1%igen Homogenates in den Photometer-Küvetten vorgelegt. Für die Bestimmung der Eichkurve diente Bovines Serum Albumin (BSA aus dem „Protein Assay“-Kit von Bio-Rad). Es wurden für die Verdünnungsreihe jeweils 0, 1, 2, 3, 4 bzw. 5 µl des BSA (1 µg/µl) in die Küvetten vorgelegt. Da die Homogenate in Sucrose verdünnt wurden, wurden auch in die Verdünnungsreihe der Eichkurve sowie in den Leerwert 8 µl 0,32 M Sucrose zugegeben und anschließend 500 µl des Dye-Reagent („Protein Assay“ von Bio-Rad), das zuvor 1:5 in Aqua bidest verdünnt wurde, pro Küvette mit einer Multipipette pipettiert. Die Proben wurden 5 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend im Photometer bei 600 nm gemessen. Anhand der nach Auswertung der Eichkurve erhaltenen Formel wurde der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben berechnet.

3.2.7.3 Proteinase K-Behandlung

Von dem 10%igen Gehirnhomogenat wurden 27 µl mit 3 µl 10x PK-Puffer versetzt. Anschließend wurde Proteinase K in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben und die Probe 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann jeweils 10 µl

Ladepuffer zugegeben und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde das gebildete Kondenswasser herunterzentrifugiert und die Proben auf das Gel aufgetragen oder vorübergehend bei -20°C eingefroren. Alle zu untersuchenden Proben wurden Proteinase K-verdaut. Gehirnhomogenate von terminal kranken Wildtyp-Mäusen dienten als Positiv-Kontrolle und Homogenate von unbehandelten Wildtyp-Mäusen als Negativ-Kontrolle. Homogenate von Kontrolltieren wurde sowohl mit als auch ohne Proteinase K-Verdau aufgetragen.

3.2.7.4 Natriumphosphorwolframsäure (NaPTA)-Fällung

Die Methode der NaPTA-Fällung basiert auf der selektiven Fällung von PrPsc-Aggregaten. Monomeres PrPc verbleibt dabei im Überstand (Safar *et al.* 1998). Bei Proben, in denen zunächst kein PrPsc nachweisbar war, wurde daher eine Fällung mit Natriumphosphorwolframsäure durchgeführt. Dazu wurden 125 µl des Homogenates mit 125 µl 4%igem Sarkosyl (in PBS-A) versetzt und für 15 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler bewegt. Anschließend wurden 5 µl Benzonase (1:10 verdünnt in PBS-A aus einer Vorratslösung mit 25 U/ml) zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (215 µg/ml) wurde erneut eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und danach 25 µl NaPTA/170 mM MgCl₂ sowie 47,5 µl eines Proteinase K-Inhibitors (Complete Mini) zugegeben. Es folgte wiederum eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 20 µl einer 0,1%igen Sarkosyl-Lösung (in PBS-A) resuspendiert, 10 µl 3x Ladepuffer zugegeben und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt.

3.2.7.5 SDS-PAGE

Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Glasplatten wurden mit 70% Ethanol gesäubert, das System (Biometra) zusammengebaut und anschließend die Gele gegossen. Nach dem Einfüllen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu vermeiden und eine gerade Gellinie zu erhalten. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Von den zu untersuchenden Proben wurden je 15 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Von Homogenaten der Kontrolltiere wurde jeweils 1 µl sowohl PK-verdaut als auch nicht PK-verdaut aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteingrößenstandard (Broad Range Marker: sc-2361) eingesetzt. Die Gelelektrophorese fand bei konstanten 10 mA pro Gel statt. Von NaPTA-gefällten Proben wurden je Homogenat 3 µl und von den Kontroll-Homogenaten je 1 µl pro Spur aufgetragen.

3.2.7.6 Western Blot Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels „Semi-Dry“-Blot-Methode in der Semi-Dry Blotkammer innerhalb 1 Stunde mit 40 mA pro Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in 5%-Magermilchpulver-TBS-T bewegt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper POM1 (0,65 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:2000 in 5%-Magermilchpulver-TBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder 4°C über Nacht. Nach Waschen der Membran für 3 mal 5 Minuten in TBS-T folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (goat-anti-mouse IgG HRP: sc-2005 und HRP-conjugated anti-biotin-antibody) für 45 Minuten bei Raumtemperatur (Verdünnung: 1:2000 in 5%-Magermilchpulver-TBS-T). Nach anschließendem Waschen mit TBS-T für 3 mal 5 Minuten wurde ECL auf die Membran gegeben. Nach 1 Minute wurde das ECL abgegossen, die Reaktion in der Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm detektiert, im Entwicklerbad entwickelt und anschließend fixiert. Entwickler- und Fixierbad wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt und regelmäßig gewechselt. Zum Schluß wurde der Röntgenfilm luftgetrocknet und digital eingelesen.

3.2.8 Expressionsanalysen

3.2.8.1 Isolierung der RNA aus Gehirngewebe

Die Gehirnproben wurden bei 4°C aufgetaut. Die Gehirne wurden gewogen, mit einem Skalpell in ca. 5 mm² große Stücke geschnitten und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß gebracht. Pro 100 mg Gehirn wurde 1 ml TriZOL zugegeben. Das Gewebe wurde dann mit einem Homogenisator zerkleinert. Dabei wurde die Geschwindigkeit langsam erhöht und das Eppendorfgefäß zwischendurch immer wieder auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Homogenate im Thermomixer bei 30°C für 10 Minuten erwärmt. Es wurde dann ein Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,0) zugegeben, kurz auf einem Vortexer gemischt und die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde erneut kurz auf einem Vortexer gemischt. Danach wurde für 5 Minuten bei 30°C im Thermomixer inkubiert und dann für 20 bis 30 Minuten bei 10 000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (ohne Interphase) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, pro 1 ml Lysat 750 µl Isopropanol zugegeben und bei 30°C für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. Die anschließende Zentrifugation wurde bei 10 000 rpm und 4°C für 15 Minuten durchgeführt. Danach wurde das Eppendorfgefäß vorsichtig geöffnet und der Überstand abgegossen. Nach Zugabe von 1 ml 75%igem Ethanol und kurzem Mischen wurde

erneut für 5 bis 10 Minuten bei 4°C und 8400 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde gründlich entfernt und das RNA-Sediment bei 56°C für 1 bis 5 Minuten im Heizblock getrocknet. Danach wurden 50 µl RNA-Storage zugegeben, nochmals kurz in 56°C gestellt und die RNA anschließend vollständig resuspendiert und auf Eis gestellt. Von einer 1:50 Verdünnung in sterilem Aqua bidest. wurde im Photometer die Konzentration der RNA bestimmt. Die restliche RNA wurde zur Aufbewahrung sofort bei -70°C eingefroren.

3.2.8.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

RNA muss vor ihrer Auftrennung denaturiert werden, da einzelsträngige RNA-Moleküle in nativem Zustand Sekundärstrukturen ausbilden, die das Laufverhalten der RNA während der Elektrophorese verändern. Daher wurde zu je 1 µl RNA-Probe 5 µl eines formaldehydhaltigen Puffers (FALD) zugegeben und für 15 Minuten auf 65°C erhitzt. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Für die Auftrennung der RNA wurde ein 1,0%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden pro 100 ml Volumen 1 g Agarose in 87 ml DEPC-H₂O und 10 ml MOPS/EDTA in einen Erlenmeyerkolben gebracht und in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden 3 ml 37%iges Formaldehyd unter dem Abzug zugegeben. Die Gelkammer wurde ebenfalls unter dem Abzug befüllt und für ca. 30 Minuten dort belassen, bis das Gel auspolymerisiert war. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS/EDTA in DEPC-H₂O verwendet. Der Gel-Vorlauf wurde für 10 Minuten bei 75V (kleines Gel) bzw. für 30 Minuten bei 50 V (großes Gel) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Leere Taschen wurden mit FALD befüllt. Zur Größenbestimmung diente ein RNA Marker. Der Gel-Lauf erfolgte bei 75 V für 45 Minuten (kleines Gel) bzw. bei 20 V über Nacht (großes Gel). Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.2.8.3 Northern-Transfer

Der Transfer von RNA aus dem Gel auf eine Hybond-N⁺-Membran erfolgte nach der Methode von Kroczeck und Siebert, 1990. Als Transferpuffer wurde 10x SSC verwendet; als Saugmaterial dienten Whatman-Filter und Zellstofftücher. Die Hybond-N⁺-Membran wurde für 5 bis 10 Minuten in DEPC-H₂O eingeweicht und auf das Gel ohne Luftblasen aufgelegt. Nach Auflegen eines Gewichtes wurde über Nacht die RNA auf die Membran transferiert. Danach wurde die Membran zweimal in 2x SSC geschwenkt, auf ein trockenes Whatman-Filterpapier aufgelegt, beschriftet und in den UV-Stratalinker gelegt, um durch UV-Cross-linking die Nukleinsäure auf der Membran zu binden. Anschließend wurde die Membran

fotografiert und dann 2 Stunden bei 80°C im Vakuum getrocknet. Nach Abkühlen wurde die Membran zur weiteren Aufbewahrung eingeschweißt.

3.2.8.4 Hybridisierung

Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten und das 230 bp große DNA-Stück von GFAP aus einem Low Melting Temperature Minigel ausgeschnitten, mit der dreifachen Menge A. bidest verdünnt, auf 65°C erhitzt und in -20°C eingefroren. Zur Herstellung der Sonde wurde das Gel bei 65°C aufgetaut, 25 µl des jetzt flüssigen Gels in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten aufgekocht. Dieses wurde auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und anschließend in ein Reaktionsgefäß (Rediprime™ II Random Prime Labelling System) gegeben. Es wurden 3 bis 5 µl [³²P] dCTP zugegeben und eine halbe Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 5 µl 0,2 M EDTA zugefügt. Die Probe wurde dann auf Eis gestellt. Anschließend wurde nicht eingebaute Radioaktivität zweimal mit TE-Puffer (400 µl) über eine Säule (illustra™ NICK™ Columns) entfernt.

Die Membran wurde nun für 1 Stunde in Pre-Wash-Puffer (0,1x SSC mit 0,5% SDS) bei 65°C gewaschen. Die Hybridisierungslösung (ULTRAhyb™) wurde bei 68°C gelöst. Danach wurde die Membran zusammengerollt, in eine Hybridisierungsflasche verbracht, 5 ml der Hybridisierungslösung zugegeben und für 2 Stunden bei 42°C im Hybridisierungsofen belassen. Anschließend wurde die Sonde für 10 Minuten gekocht, zugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen in 2x SSC mit 0,5% SDS bei 42°C gefolgt von mehrmaligem Waschen in 0,1x SSC mit 1% SDS.

3.2.8.5 Autoradiographie

Überschüssige Flüssigkeit wurde von der Membran auf einem Whatman-Filter entfernt. Anschließend wurde die Membran feucht in Frischhaltefolie eingewickelt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (BioMax XAR, Kodak) mit Verstärkerfolie (Perlux) aufgelegt und bei -70°C für 1 Stunde bis 7 Tage exponiert. Danach wurde die kalte Filmkassette zunächst in der Wärme getrocknet. Der Röntgenfilm wurde dann in der Dunkelkammer im Entwicklerbad entwickelt, kurz gewässert, im Fixiererbad fixiert, gespült und an der Luft getrocknet. Das Autoradiogramm wurde mit der DC120 Zoom-Kamera digitalisiert.

3.2.8.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten: der Denaturierung der Matrizen-DNA, der Hybridisierung (Anlagerung der Primer, „Annealing“) und der Verlängerung der DNA-Stränge. In dieser Arbeit sollte die GFAP-Genexpression untersucht werden. Als Standard diente hierbei Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse. Es wird, ähnlich wie β -Aktin, als Vergleichswert eingesetzt, da seine Expression in allen Zellen nahezu konstant ist. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Nach Herstellung der RNA-Vorverdünnung (0,5 μ g/ml in 2x RNA Secure) wurde der GFAP- bzw. GAPDH-Mastermix angesetzt.

Mastermix:

RT-PCR Puffer 5x	je 2,00 μ l
dNTP	je 0,40 μ l
Primer	je 1,00 μ l
Enzyme-Mix	je 0,40 μ l
RNase-free H ₂ O	ad 9,00 μ l

Zu je 1 μ l RNA-Vorverdünnung wurden jeweils 9 μ l Mastermix pipettiert und die PCR-Reaktionsgefäße wurden sofort in den Thermocycler gestellt. Die einzelnen Schritte verliefen wie folgt:

GFAP:

Schritt 1	30 min bei 50°C
Schritt 2	15 min bei 95°C
Schritt 3	1 min bei 95°C
Schritt 4	1 min bei 55°C
Schritt 5	1 min bei 72°C
Schritt 6	10 min bei 72°C
Schritt 7	abkühlen auf 4°C

GAPDH:

Schritt 1	30 min bei 50°C
Schritt 2	15 min bei 95°C
Schritt 3	1 min bei 95°C
Schritt 4	30 sec bei 60°C
Schritt 5	30 sec bei 72°C
Schritt 6	10 min bei 72°C
Schritt 7	abkühlen auf 4°C

Die Anzahl der Reaktionszyklen (Schritt 3 bis 5) lag für GFAP bei 20 und für GAPDH bei 18. Aufgrund der zuvor ausgetesteten, limitierten Reaktionszyklen blieb die RT-PCR im linearen Amplifikationsbereich. Somit war eine semi-quantitative Auswertung der Ergebnisse möglich. Die Proben wurden nach Beendigung des Programms im Thermocycler auf 4°C heruntergekühlt und zur weiteren Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

3.2.8.7 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 2,5%igen Metaphor-Gel. Zur Herstellung wurden 2,5 g Metaphor-Agarose in einen 300 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und 100 ml

1x EP-Puffer sowie 3 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die Mischung wurde in einer Mikrowelle kurz aufgekocht und danach für 1 Stunde bei 80°C ins Wasserbad gestellt. Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde Laufpuffer (1x EP-Puffer + 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) bis zur oberen Kante des Gels eingefüllt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Die PCR-Proben wurden auf Eis aufgetaut. Zu jeder Probe wurden 2 µl BSE pipettiert und die Proben auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente HyperLadder IV bzw. V. Der Gel-Lauf wurde bei 60 V für 3 Stunden und 45 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Gel fotografiert und am Thyphoon eingescannt.

3.2.8.8 Densitometrie

Sowohl bei dem nach Northern Blothybridisierung digitalisierten Autoradiogramm als auch bei dem nach PCR erhaltenen Bild wurden die einzelnen Banden mit dem Kodak Digital Science 1D-Softwareprogramm vermessen und densitometrisch ausgewertet. Nach Vermessung des PCR-Bildes wurde das GFAP/GAPDH-Verhältnis berechnet. Der Vergleich der Signalstärken der GFAP-spezifischen mRNA mit der 18S rRNA als Standard im Autoradiogramm wurde als GFAP/18S-Verhältnis angegeben.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden mögliche Zusammenhänge zwischen klinischem Verlauf und neuropathologischen Charakteristika von Scrapie nach verschiedenen Inokulationswegen (intrazerebral, intraperitoneal und oral) im Mausmodell untersucht. Hierzu wurde der Verlauf der Erkrankung in drei Stadien eingeteilt: Präklinisches Stadium (klinisch unauffällige Tiere), in dem drei aufeinander folgende Zeitwerte (1., 2. und 3. Zw.) ausgewertet wurden, sowie frühes klinisches (erste Scrapie-assoziierte Symptome) und spätes klinisches (deutlich ausgeprägtes Krankheitsbild) Krankheitsstadium (siehe Kapitel 3.2.5). Da nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat der überwiegende Teil der Tiere klinisch unauffällig blieb (siehe Kapitel 4.1.3.1.1), ergaben sich hier fünf präklinische Zeitwerte. Nach oraler Gabe des 10%igen Homogenates wurden nur klinisch kranke Tiere (frühes und spätes Stadium) analysiert. Zur besseren Übersicht werden im Folgenden die Farben rot für CD-1-Mäuse, blau für C57/Bl6-Mäuse und grün für tga20-Mäuse vergeben.

Proben, die für die Untersuchungen an Gefrierschnitten entnommen worden waren, wurden in dieser Arbeit nicht ausgewertet. Bezüglich des klinischen Verlaufs und der Symptome von Scrapie bei den drei Mausstämmen konnten bei Tieren, die für die Entnahme von Cryo-Proben inokuliert worden waren, keine Unterschiede zu den hier beschriebenen Ergebnissen festgestellt werden.

4.1 Klinische Beurteilung der Mäuse

Nach Inokulation wurden die Tiere bis zum ersten Auftreten von klinischen Symptomen zweimal wöchentlich, danach täglich beobachtet. Beurteilt wurden die Entwicklung der klinischen Symptome im zeitlichen Verlauf nach intrazerebraler, intraperitonealer und oraler Inokulation.

4.1.1 Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)

4.1.1.1 Krankheitsverlauf

Der zeitliche Verlauf der Erkrankung und die Anzahl der ausgewerteten Tiere nach ic-Inokulation sind in Tabelle 2 dargestellt. Es wurden grundsätzlich jeweils 4 Tiere pro Stadium bzw. pro Zeitwert (20 Tiere insgesamt pro Mausstamm) ausgewertet. Im späten klinischen Stadium standen fünf tga20-Mäuse zur Verfügung. Daher ergab sich für diesen Mausstamm eine Gesamtzahl von 21 ausgewerteten Tieren. Nach ic-Inokulation wurden im präklinischen Stadium zu drei Zeitwerten (Zw) von allen Mausstämmen Proben entnommen. Aufgrund der

kürzeren Inkubationszeiten der transgenen tga20-Mäuse (Fischer *et al.* 1996) erfolgte die Probenentnahme für diesen Mausstamm früher als bei den beiden Wildtyp-Mausstämmen. Die Zeitwerte für die Probenentnahmen in den klinischen Krankheitsstadien der beginnenden Erkrankung und dem späten Stadium ergaben sich je nach Krankheitsverlauf (Tab. 2). Innerhalb eines Mausstammes war der Krankheitsverlauf nach ic-Inokulation recht homogen. Die jeweiligen Tiere erkrankten etwa zur gleichen Zeit.

CD-1-Wildtyp-Mäuse zeigten nach 119 bzw. 121 dpi erste Scrapie-spezifische Symptome. Im Vergleich dazu waren bei C57/Bl6-Mäusen bereits nach 97 bzw. 98 Tagen nach der Infektion erste Anzeichen einer Scrapie-Erkrankung festzustellen. Wie erwartet wiesen tga20-Mäuse die kürzeste Inkubationszeit auf. Sie erkrankten nach 48 bzw. 49 dpi.

Das späte Krankheitsstadium erreichten die CD-1-Mäuse nach 142 bis 149 Tagen, die C57/Bl6-Mäuse nach 149 bis 158 Tagen und die tga20-Mäuse nach 57 bis 64 dpi.

Krankheitsstadium	Mausstamm (Tiere insgesamt)		
	CD-1 (20)	C57/Bl6 (20)	tga20 (21)
präklinisches Stadium			
1. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	28 (4)	30 (4)	12 (4)
2. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	62 (4)	61 (4)	20 (4)
3. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	90 (3)	93 (4)	40 (2)
	92 (1)		41 (1)
			42 (1)
frühes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	119 (2)	97 (2)	48 (2)
	121 (2)	98 (2)	49 (2)
spätes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	142 (3)	149 (1)	57 (2)
	149 (1)	157 (2)	61 (1)
		158 (1)	62 (1)
			64 (1)

Tabelle 2: Zeitlicher Verlauf der Erkrankung und Anzahl der Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach ic-Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation.

4.1.1.2 Klinische Symptome

Gemeinsames Symptom aller drei Mausstämme war zu Beginn der Erkrankung eine fortschreitende Ataxie (Tab. 3). Alle untersuchten Tiere des CD-1-Wildtypstammes zeigten sich zudem lethargisch, während 50% der C57/Bl6-Mäuse und 100% der tga20-Mäuse zunächst hyperaktiv waren. Außerdem hatten CD-1-Mäuse in diesem frühen Stadium bereits

ein struppiges und stumpfes Fell in 75% aller Fälle, während das Fell der beiden anderen Mausstämme noch nicht verändert war. Alle Tiere der C57/Bl6- und tga20-Mäuse wiesen bereits eine deutliche Kyphose auf, die bei CD-1-Mäusen erst im späten Krankheitsstadium auftrat (Tab. 3).

Mausstamm:	CD-1		C57/Bl6		tga20	
klinisches Stadium:	früh	spät	früh	spät	früh	spät
dpi	119-121	142-149	97-98	149-158	48-49	57-64
Symptome	% der erkrankten Tiere					
Ataxie:	100	100	50	100	100	100
Abmagerung:		100		100		100
Lethargie:	100	100		100		100
struppiges Fell:	75	100		75		80
Hyperaktivität:			50		100	
Kyphose:		100	100	100	100	100
senkrecht aufgestellter Schwanz:		75				40
Parese HGM:	25		50	100		
Zuckungen Hautmuskulatur Rücken:				100		
langgestreckte Körperhaltung:						

Tabelle 3: Klinische Symptome der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach ic-Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation, HGM = Hintergliedmaßen.

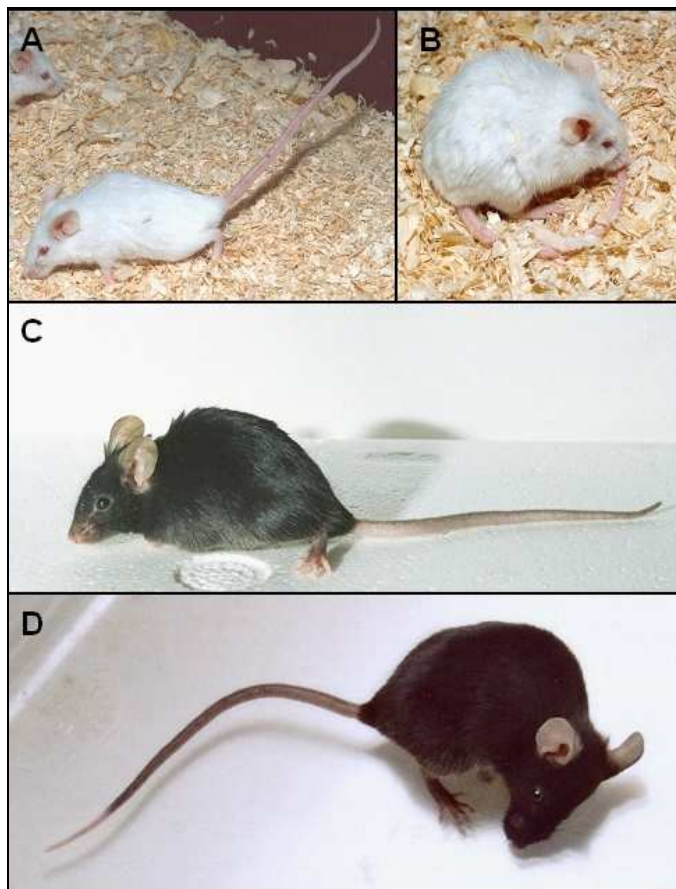


Abbildung 10: Klinisches Bild der drei Mausstämme im späten Krankheitsstadium nach intrazerebraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat von RML.

A und B: CD-1-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges, stumpfes Fell, Kyphose und ein senkrecht aufgestellter Schwanz (A).

C: C57/Bl6-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges, stumpfes Fell, Kyphose und Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße.

D: tga20-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges, stumpfes Fell und Kyphose.

Alle Tiere der drei Mausstämme zeigten im späten klinischen Krankheitsstadium eine fortgeschrittene Ataxie und Kyphose (Tab. 3, Abb. 10). Wie die CD-1-Mäuse wurden nun auch alle C57/Bl6- und tga20-Mäuse zunehmend lethargisch. Zudem waren alle Tiere deutlich magerer im Vergleich zu gleichaltrigen, unbehandelten Mäusen bzw. Mäusen, die mit 1%igem Hirnhomogenat gesunder Mäuse inokuliert wurden. Ein weiteres wichtiges Merkmal der Tiere im späten Stadium der Erkrankung war die Ausbildung eines struppigen und stumpfen Fells (Abb. 10).

Ein Unterschied konnte bei den C57/Bl6-Mäusen festgestellt werden. Ausschließlich Tiere dieses Mausstammes zeigten in unregelmäßigen Abständen auftretende Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens. Außerdem fiel eine Parese der Hintergliedmaßen (HGM) mit deutlicher lateraler Abspreizung der Hinterfüße auf (Tab. 3, Abb. 10 C).

4.1.2 Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation)

4.1.2.1 Krankheitsverlauf

Der zeitliche Verlauf der Erkrankung und die Anzahl der ausgewerteten Tiere nach ip-Inokulation sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden überwiegend jeweils 4 Tiere pro Stadium bzw. Zeitwert ausgewertet. Für den dritten Zeitwert (3. Zw) im präklinischen Stadium der CD-1-Mäuse wurden nur 3 Tiere und in der Gruppe der C57/Bl6-Mäuse im späten klinischen Stadium wurden 5 Tiere untersucht. Somit ergab sich eine Gesamtzahl der Tiere nach ip-Inokulation von 19 CD-1-Mäusen, 21 C57/Bl6-Mäusen und 20 tga20-Mäusen. Auch nach ip-Inokulation wurden von klinisch gesunden Tieren zu drei verschiedenen Zeitwerten (Zw) Proben entnommen (Tab. 4). Wie nach ic-Inokulation wurden aufgrund der zu erwartenden kürzeren Inkubationszeiten von den transgenen tga20-Mäusen bereits früher Proben gewonnen. Die Zeitpunkte der Probenentnahme in den beiden folgenden klinischen Krankheitsstadien war von dem jeweiligen Krankheitsverlauf bestimmt. Wie auch nach intrazerebraler Inokulation erkrankten alle Tiere eines Mausstammes etwa zur gleichen Zeit, wobei bei den CD-1-Mäusen nach 168 dpi und bei den C57/Bl6-Mäusen nach 162 dpi jeweils ein Tier mit beginnenden Symptomen beobachtet wurde. Alle übrigen CD-1-Mäuse wurden nach 175 dpi, die C57/Bl6-Mäuse nach 182 dpi krank. Erwartungsgemäß zeigten tga20-Mäuse bereits nach 76 bzw. 77 dpi erste klinische Symptome einer Scrapie-Erkrankung.

Das späte Krankheitsstadium erreichten die CD-1-Mäuse nach 188 bis 224 dpi, die C57/Bl6-Mäuse nach 195 bis 212 dpi und die tga20-Mäuse nach 80 bis 84 Tagen nach Inokulation.

Krankheitsstadium	Mausstamm (Tiere insgesamt)		
	CD-1 (19)	C57/Bl6 (21)	tga20 (20)
präklinisches Stadium			
1. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	62 (4)	62 (4)	20 (4)
2. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	91 (4)	92 (4)	41 (4)
3. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	168 (3)	162 (4)	62 (4)
frühes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	168 (1)	162 (1)	76 (2)
	175 (3)	182 (3)	77 (2)
spätes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	188 (2)	195 (1)	80 (2)
	195 (1)	204 (2)	81 (1)
	224 (1)	211 (1)	84 (1)
		212 (1)	

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf der Erkrankung und Anzahl der Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach ip-Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation.

4.1.2.2 Klinische Symptome

Insgesamt war die Symptomatik bei den Wildtyp-Mäusen nach ip- und ic-Inokulation gut vergleichbar (Tab. 5, Abb. 11 A bis C). Wichtigste Symptome zu Beginn der Erkrankung waren Ataxie und Lethargie. Die CD-1-Mäuse wiesen erneut bereits zu Beginn der Erkrankung ein struppiges und stumpfes Fell auf, während dies bei den C57/Bl6-Mäusen erst im späten Stadium auftrat. Bei den C57/Bl6-Mäusen konnten bereits im frühen Stadium der Erkrankung die beschriebenen, für C57/Bl6-Mäuse offenbar typische, Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens und die Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße bei 75% der Tiere festgestellt werden, das sich im weiteren Verlauf verstärkte (Tab. 5, Abb. 11 C). Die tga20-Mäuse zeigten als eines der ersten Symptome ebenfalls Ataxie, außerdem jedoch Hyperaktivität in 50% der Fälle und, im Gegensatz zu ic-Inokulation und zu beiden Wildtyp-Mausstämmen, eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne die Ausbildung einer Kyphose bei allen Tieren (Tab. 5).

Mausstamm:	CD-1		C57/B16		tga20	
klinisches Stadium:	früh	spät	früh	spät	früh	spät
dpi	168-175	188-224	162-182	195-212	76-77	80-84
Symptome	% der erkrankten Tiere					
Ataxie:	100	100	100	100	100	100
Abmagerung:		100		80		100
Lethargie:	100	75	75	100		
struppiges Fell:	100	100		100		
Hyperaktivität:					50	75
Kyphose:		75	25	100		
senkrecht aufgestellter Schwanz:		50				100
Parese HGM:	25		75	80		
Zuckungen Hautmuskulatur Rücken:			75	100		
langgestreckte Körperhaltung:					100	100

Tabelle 5: Klinische Symptome der drei Mausstämme (CD-1, C57/B16 und tga20) nach ip-Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation, HGM = Hintergliedmaßen.

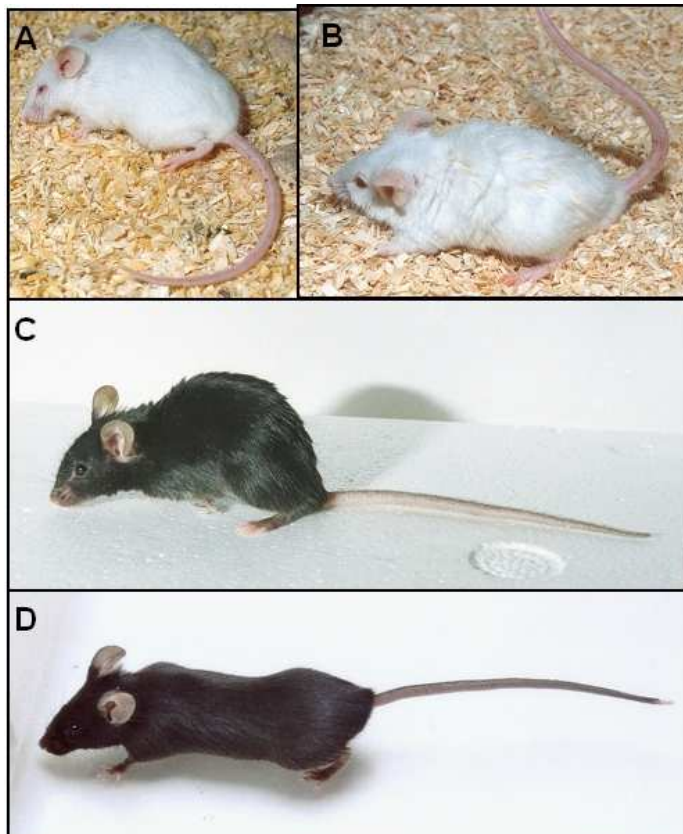


Abbildung 11: Klinisches Bild der drei Mausstämme im späten Krankheitsstadium nach intraperitonealer Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat von RML.

A und B: CD-1-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges und stumpfes Fell, Kyphose und senkrecht aufgestellter Schwanz (B).

C: C57/B16-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges und stumpfes Fell, Kyphose und Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße.

D: tga20-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie eine langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose.

Wichtige Symptome aller drei Mausstämme im späten Krankheitsstadium waren Ataxie, Abmagerung und Lethargie sowie Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens und Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße bei den C57/B16-Mäusen. Alle Tiere der Wildtyp-Mausstämme hatten außerdem ein struppiges und stumpfes Fell (Tab. 5, Abb. 11 A bis C). Die ip-inokulierten tga20-Mäuse unterschieden sich in der Symptomatik eindeutig von den Wildtyp-Mäusen und von ic-inokulierten tga20-Mäusen, da

sie eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne Kyphose und ein unverändertes Fell zeigten (Tab. 5, Abb. 11 D).

4.1.3 Orale Inokulation

4.1.3.1 Krankheitsverlauf

4.1.3.1.1 Orale Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat

Es wurden jeweils 28 Tiere pro Mausstamm mit einem 1%igen Gehirnhomogenat von RML oral inokuliert. Es erkrankten jedoch jeweils nur einzelne Tiere, so dass sich keine einheitlichen Inkubationszeiten innerhalb eines Mausstammes für die verschiedenen Krankheitsstadien beobachten ließen und die Tiere über einen relativ langen Zeitraum gehalten wurden (Tab. 6). Aufgrund der langen Inkubationszeiten musste letztlich eine relativ hohe Anzahl der Tiere wegen anderer krankhafter Veränderungen wie z.B. Dermatitis, Augenentzündung, vergrößerten Lymphknoten oder Tumore getötet werden. Nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat konnten deshalb insgesamt nur 19 CD-1-, 16 C57/Bl6- und 15 tga20-Mäuse untersucht werden (Tab. 6).

Von den 28 inokulierten CD-1-Mäusen erkrankten lediglich sechs Tiere. Vier Tiere wurden mit beginnenden klinischen Symptomen untersucht (210 dpi), zwei Tiere wurden im späten Krankheitsstadium getötet (237 und 257 dpi). Dreizehn Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten nach Inokulation ohne klinische Symptome untersucht (Tab. 6).

Von den C57/Bl6-Mäusen erkrankten vier Tiere. Ein Tier wurde mit beginnenden Symptomen (262 dpi) getötet, drei Tiere wurden im späten klinischen Stadium nach 226, 252 und 268 dpi ausgewertet. Zwölf Tiere konnten zu verschiedenen Zeiten nach Inokulation ohne klinische Symptome untersucht werden (Tab. 6).

Scrapie-spezifische Symptome nach oraler Inokulation bei den tga20-Mäusen konnten bei vier Tieren festgestellt werden. Zwei Tiere wurden mit beginnenden Symptomen (142 und 153 dpi) und zwei Tiere wurden im späten Stadium von Scrapie getötet (139 und 145 dpi). Elf Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitwerten ohne klinische Symptome ausgewertet (Tab. 6).

Krankheitsstadium	Mausstamm (Tiere insgesamt)		
	CD-1 (19)	C57/Bl6 (16)	tga20 (15)
präklinisches Stadium			
1. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	166 (4)	166 (3)	90 (4)
2. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	212 (1)	212 (3)	216 (1)
			218 (2)
3. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	261 (2)	262 (2)	
4. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	306 (3)	300 (2)	300 (1)
			306 (2)
5. Zeitwert dpi (Anzahl der Tiere):	500 (3)	517 (2)	455 (1)
frühes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	210 (4)	262 (1)	142 (1)
			153 (1)
spätes klinisches Stadium			
dpi (Anzahl der Tiere):	237 (1)	226 (1)	139 (1)
	257 (1)	252 (1)	145 (1)
		268 (1)	

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf der Erkrankung und Anzahl der Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach oraler Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation.

Aufgrund der geringen Tierzahlen pro Zeitwert im präklinischen Krankheitsstadium (siehe Tab. 6) wird dieses Stadium in den folgenden Kapiteln nicht wie nach ic- und ip-Inokulation in einzelne Zeitwerte eingeteilt.

Dass nach oraler Inokulation mit einem 1%igem Gehirnhomogenat von RML-Prionen nur einzelne Tiere sporadisch Symptome für Scrapie zeigten, könnte auf eine zu niedrige Inokulationsdosis zurückzuführen sein. Daher wurde zusätzlich zehn CD-1-Mäusen stellvertretend für beide Wildtyp-Mausstämme und zehn tga20-Mäusen ein 10%iges Gehirnhomogenat von RML oral verabreicht.

4.1.3.1.2 Orale Inokulation mit 10%igem Gehirnhomogenat

Die Probenentnahme nach oraler Inokulation mit 10%igem Hirnhomogenat erfolgte ausschließlich im frühen und im späten klinischen Stadium der Erkrankung (Tab. 7). Jetzt zeigten alle inokulierten Mäuse für Scrapie typische Symptome, wobei jedoch die Zeitpunkte der Erkrankung wiederum uneinheitlich waren.

Krankheitsstadium	Mausstamm (Tiere insgesamt)	
	CD-1 (8)	tga20 (6)
frühes klinisches Stadium		
dpi (Anzahl der Tiere):	175 (1)	75 (1)
	188 (1)	140 (1)
	200 (1)	145 (1)
	215 (1)	
spätes klinisches Stadium		
dpi (Anzahl der Tiere):	210 (1)	95 (1)
	220 (1)	109 (1)
	235 (1)	137 (1)
	260 (1)	

Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der Erkrankung und Anzahl der Tiere der beiden Mausstämme (CD-1 und tga20) nach oraler Inokulation mit RML (10%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation.

Jeweils ein Tier des CD-1-Mausstammes zeigte nach 175, 188, 200 bzw. 215 dpi erste Symptome einer Scrapie-Erkrankung. Vier CD-1-Mäuse wurden im späten Krankheitsstadium nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (210, 220, 235 und 260 dpi) untersucht. Zwei Tiere mussten aufgrund anderer Erkrankungen euthanasiert werden und kamen nicht zur Auswertung.

Drei tga20-Mäuse zeigten nach 75, 140 bzw. 145 dpi erste Anzeichen für Scrapie, weitere drei Tiere wurden nach 95, 109 bzw. 137 dpi im späten Krankheitsstadium untersucht. Vier tga20-Mäuse Tiere mussten aufgrund anderer Erkrankungen getötet werden und konnten nicht ausgewertet werden.

4.1.3.2 Klinische Symptome

Zwischen den Gruppen der mit 1%igem bzw. 10%igem Gehirnhomogenat oral inokulierten Tiere konnten bezüglich der klinischen Symptomatik keine markanten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 8 und 9). Wie nach ip-Inokulation waren die tga20-Mäuse auch nach oraler Infektion mit RML anhand der klinischen Symptome klar von den Tieren beider Wildtyp-Mausstämme sowie von ic-inokulierten tga20-Mäusen unterscheidbar. Während die Symptome der Wildtyp-Mäuse denen nach ic- und ip-Inokulation ähnelten, zeigten die tga20-Mäuse auch nach oraler Inokulation ein vergleichbares Bild wie nach ip-Inokulation und somit einen deutlichen Unterschied zu ic-inokulierten Tieren (Tab. 8 und 9). Wie schon nach ip-Inokulation wiesen Tiere dieses Mausstammes bereits zu Beginn der Erkrankung eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose auf, die im späten

Krankheitsstadium noch deutlicher wurde. Daneben traten Ataxie, Lethargie und Abmagerung auf (Tab. 8 und 9, Abb. 12 C).

Alle CD-1-Mäuse waren nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat mit einsetzenden Symptomen zunächst hyperaktiv. Im späten Krankheitsstadium zeigten sich die Tiere jedoch auch hier zunehmend lethargisch und somit ähnliche Symptome wie nach den beiden vorangegangenen Inokulationswegen (Tab. 8, Abb. 12 A).

Mausstamm:	CD-1		C57/Bl6		tga20	
klinisches Stadium:	früh	spät	früh	spät	früh	spät
dpi	210	237-257	262	226-268	142-153	139-145
Symptome	% der erkrankten Tiere					
Ataxie:	100	100	100	100	100	100
Abmagerung:	100	100	100	100	50	100
Lethargie:		100		100		100
struppiges Fell:		100		100		
Hyperaktivität:	100					
Kyphose:		100	100	100		
senkrecht aufgestellter Schwanz:		50				
Parese HGM:				67		50
Zuckungen Hautmuskulatur Rücken:				100		
langgestreckte Körperhaltung:					100	100

Tabelle 8: Klinische Symptome der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach oraler Inokulation mit RML (1%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation, HGM = Hintergliedmaßen.

Bei den C57/Bl6-Mäusen waren keine Unterschiede zu den vorangegangenen Inokulationswegen festzustellen. Die Symptome der Mausstämme nach oraler Inokulation sind in den Tabellen 8 und 9 zusammengefasst.

Mausstamm:	CD-1		tga20	
klinisches Stadium:	früh	spät	früh	spät
dpi	175-215	210-260	75-145	95-137
Symptome	% der erkrankten Tiere			
Ataxie:	100	100	100	100
Abmagerung:	75	100	33	100
Lethargie:		100		100
struppiges Fell:		75		
Hyperaktivität:				
Kyphose:		75		
senkrecht aufgestellter Schwanz:		25	33	
Parese HGM:	50	25		
Zuckungen Hautmuskulatur Rücken:				
langgestreckte Körperhaltung:			100	100

Tabelle 9: Klinische Symptome der beiden Mausstämme (CD-1 und tga20) nach oraler Inokulation mit RML (10%iges Gehirnhomogenat). Dpi = Tage nach Inokulation, HGM = Hintergliedmaßen.

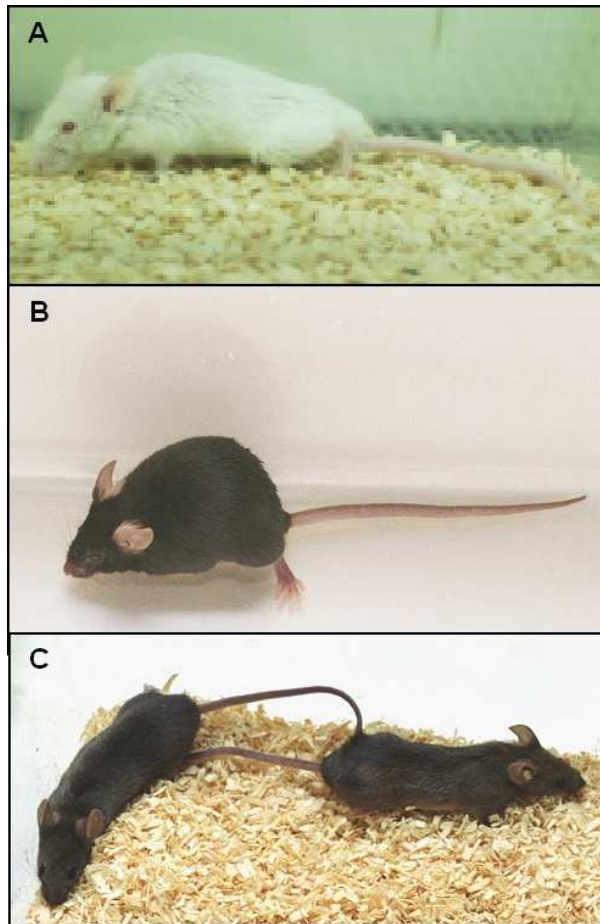


Abbildung 12: Klinisches Bild der drei Mausstämmen im späten Krankheitsstadium nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat von RML.

A: CD-1-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges und stumpfes Fell und Kyphose.

B: C57/Bl6-Maus: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie struppiges und stumpfes Fell, Kyphose und Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße.

C: tga20-Mäuse: Ataxie, Lethargie, Abmagerung sowie eine langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose.

4.1.4 Zusammenfassung

Die klinische Beurteilung ergab Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen, wobei tga20-Mäuse auch Unterschiede bei den verschiedenen Inokulationsrouten aufwiesen.

Beide Wildtyp-Mausstämmen zeigten insgesamt ein ähnliches klinisches Bild nach allen drei Inokulationswegen. Wichtigste Symptome waren eine fortschreitende Ataxie, Abmagerung und Lethargie sowie ein struppiges, stumpfes Fell und eine deutlich ausgebildete Kyphose. Bei C57/Bl6-Mäusen trat zusätzlich ein für diesen Mausstamm charakteristisches nervöses Symptom auf: In unregelmäßigen Abständen auftretende Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens sowie eine Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße.

Die klinische Symptomatik der tga20-Mäuse nach ic-Inokulation war derjenigen der CD-1-Mäuse sehr ähnlich. Nach den peripheren Inokulationswegen (intraperitoneal und oral) zeigte sich bei den tga20-Mäusen jedoch ein anderes klinisches Bild. Neben Ataxie, Abmagerung und Lethargie wiesen die tga20-Mäuse ausschließlich nach intraperitonealer und oraler Inokulation eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose und

ohne Veränderungen des Fells auf. Demnach war bei tga20-Mäusen die Ausprägung der klinischen Symptome abhängig von der Inokulationsroute.

4.2 Beurteilung der Vakuolisierung

Das Auftreten von Vakuolen im ZNS ist typisch für Transmissible Spongiforme Enzephalopathien. Dieses charakteristische histologische Bild führte zu der Bezeichnung „spongiforme“ (schwammartige) Enzephalopathie. In diesem Kapitel wird die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen in den Gehirnen von CD-1-, C57/Bl6- und tga20-Mäusen nach den unterschiedlichen Inokulationsrouten (intrazerebral, intraperitoneal und oral) mit dem maus-adaptierten Prionen-Stamm RML sowohl innerhalb eines Mausstammes als auch zwischen den verschiedenen Stämmen im Verlauf von Scrapie verglichen.

Zur Beurteilung der Vakuolisierung wurde je eine Gehirnhälfte der Mäuse mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und nach Anfertigung von histologischen Schnitten nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) beurteilt. Die Auswertung erfolgte am Sagittalschnitt der Gehirnhälften und es wurden drei große Bereiche des Gehirns beurteilt (Abb. 13, siehe auch Kapitel 3.2.6.7).

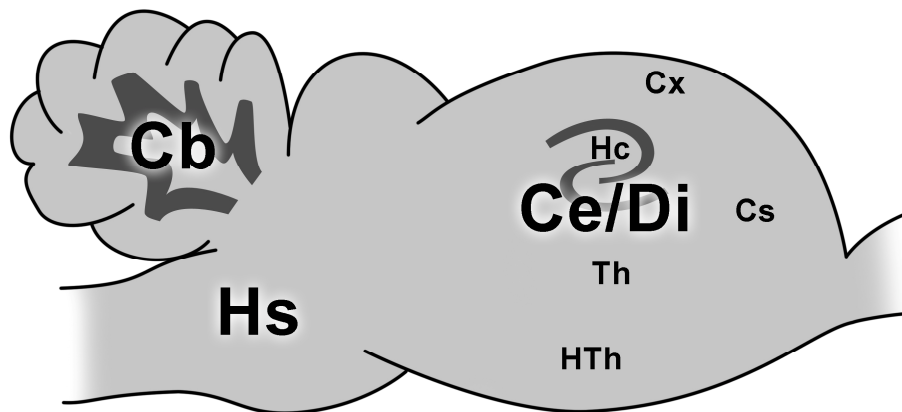


Abbildung 13 : Schema eines Sagittalschnitts durch das Gehirn einer Maus. **Cb** = Cerebellum; **Hs** = Hirnstamm; **Ce/Di** = Cerebrum und Dienzephalon mit Cortex (Cx), Hippocampus (Hc), Corpus striatum (Cs), Thalamus (Th) und Hypothalamus (HTh).

Bei älteren Mäusen kommt es häufig zur Ausbildung von TSE-unspezifischen Vakuolen im Gehirn, sogenannten Altersvakuolen (Abb. 14 A). Diese sind nicht durch eine TSE verursacht. Sie sind im Gegensatz zu TSE-spezifischen Vakuolen, die sich eher kreisrund darstellen, oval und unregelmäßiger angeordnet. Im Kleinhirn einer nicht-behandelten CD-1-Maus konnten Altersvakuolen nach 310 Tagen nachgewiesen werden. Nach 500 Tagen wiesen auch der Hirnstamm und der Bereich des Cerebrums/Dienzephalons diese Art der Vakuolen auf. In

den Gehirnen der C57/Bl6-Mäuse zeigten sich erst nach 517 Tagen Altersvakuolen, die jedoch ausschließlich im Kleinhirn lokalisiert waren. In den untersuchten tga20-Gehirnen fanden sich, ähnlich wie bei den CD-1-Mäusen, nach 300 Tagen die ersten Altersvakuolen im Kleinhirn. Nach 455 dpi waren diese auch im Bereich des Hirnstammes nachweisbar.

In einigen Fällen wiesen auch jüngere, nicht-inokulierte, klinisch unauffällige Kontrolltiere (z.B. eine CD-1-Maus nach 92 Tagen bzw. eine tga20-Maus nach 90 Tagen) einzelne kleine, ebenfalls kreisrunde Vakuolen in einer Lokalisation im Gehirnschnitt auf (Abb. 14 B und C). Diese vereinzelt auftretenden Vakuolen sind in geringer Anzahl in Gehirnen von Haustieren beschrieben worden und werden als Zufallsbefund betrachtet (Sullivan 1985). Sie sind nicht TSE-spezifisch.

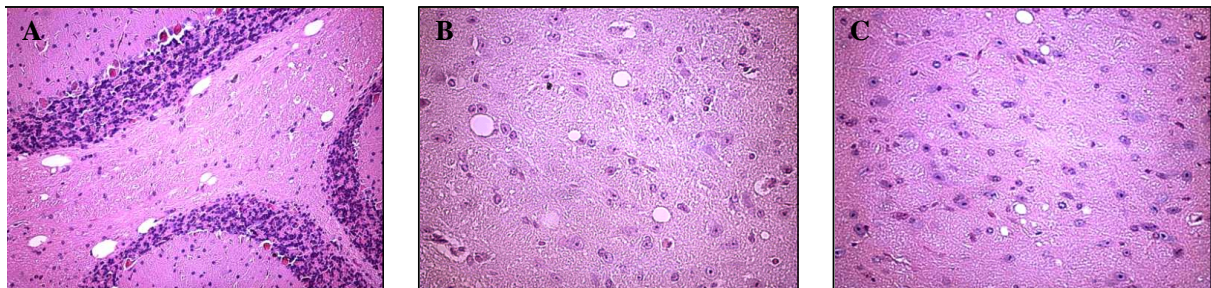


Abbildung 14: A: Altersvakuolen im Kleinhirn einer nicht-inokulierten, gesunden CD-1-Maus nach 500 Tagen (Vergrößerung: 20x). B + C: TSE-unspezifische Vakuolen in der Colliculi-Region. B: Nicht-inokulierte, klinisch unauffällige CD-1-Maus nach 92 Tagen (Vergrößerung: 40x); C: Nicht-inokulierte, klinisch unauffällige tga20-Maus nach 90 Tagen (Vergrößerung: 40x).

4.2.1 Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)

Bei klinisch unauffälligen Tieren aller drei untersuchten Mausstämme (präklinisches Stadium) konnten zu den beiden frühesten Zeitwerten (Tab. 2) keine TSE-spezifischen Vakuolen nachgewiesen werden (1. Zw: Ergebnisse nicht gezeigt; 2. Zw: Siehe Kapitel 4.4.1.1, Tab. 19, Abb. 37). Zum Zeitpunkt der dritten präklinischen Probenentnahme (Tab. 2) waren jedoch in den Gehirnen der beiden Wildtyp-Mausstämme bereits bei allen ausgewerteten Tieren deutliche Vakuolen in den untersuchten Regionen des Gehirns erkennbar (Tab. 10). Dabei wiesen CD-1-Mäuse mit einem Vakuolisierungsgrad von 1 bis 4 vor allem im Kleinhirn und im Bereich des Hirnstammes eine stärkere Vakuolisierung auf als die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse (Grad 1 bis 2) (Abb. 15 A und B), bei denen das Kleinhirn zu diesem frühen Zeitpunkt der Erkrankung noch nicht betroffen war (Tab. 10). Die Gehirne der tga20-Mäuse, die zu diesem Zeitwert entnommen worden waren, konnten aufgrund eines technischen Fehlers bei der Einbettung in der Histologie nicht ausgewertet werden.

Mit beginnenden klinischen Symptomen zeigten, wie auch im präklinischen Stadium, die CD-1-Mäuse die am stärksten ausgeprägten Läsionen. Mit einem Vakuolisierungsgrad von 4 waren die Bereiche des Kleinhirns und des Hirnstammes am stärksten betroffen (Tab. 10, Abb. 15 D). Dort zeigten sich sehr große Vakuolen, die zum Teil ineinander übergingen. Dies entsprach bereits dem Grad der Vakuolisierung, der sich später auch bei CD-1-Mäusen mit ausgeprägten Krankheitssymptomen zeigen sollte (Tab. 10, Abb. 15 G). Im Vergleich dazu waren die Gehirne von C57/Bl6-Mäusen auch zu Beginn der Erkrankung insgesamt geringer vakuolisiert (Grad 1 bis 3) (Tab. 10, Abb. 15 E). Am deutlichsten zeigte sich dieser Unterschied im Bereich des Kleinhirns, in dem nur bei einem der drei ausgewerteten Tiere gering- bis mittelgradig ausgebildete Vakuolen nachweisbar waren (Tab. 10).

In der Gruppe der tga20-Mäuse wiesen im Gegensatz zu den beiden Wildtyp-Mausstämmen nicht alle Tiere spongiforme Läsionen im Gehirn auf (Tab. 10). Es konnte lediglich bei zwei von vier Tieren eine geringgradige Vakuolisierung im Bereich des Cerebrums/Diencephalons und zusätzlich bei einem dieser Tiere gering- bis mittelgradig ausgeprägte Läsionen im Hirnstamm nachgewiesen werden (Tab. 10, Abb. 15 F).

Auch im späten klinischen Stadium von Scrapie bestätigten sich die zuvor beschriebenen Befunde. Obwohl jetzt auch alle transgenen Mäuse spongiforme Veränderungen aufwiesen, waren die Gehirne beider Wildtyp-Mausstämme weiterhin deutlich stärker vakuolisiert (Tab. 10, Abb. 15 G bis I). Dies zeigte sich insbesondere im Bereich des Kleinhirns, der lediglich bei einer von fünf tga20-Mäusen gering- bis mittelgradig ausgeprägte Läsionen aufwies (Tab. 10). Innerhalb der Wildtyp-Mausstämme zeigten die Gehirnschnitte der C57/Bl6-Mäuse erneut eine insgesamt etwas schwächere Vakuolisierung als die Gehirne der CD-1-Mäuse. Eine hochgradige Vakuolisierung konnte in keiner der untersuchten Proben der C57/Bl6-Mäuse nachgewiesen werden. Allerdings zeigten nun auch alle untersuchten Tiere dieses Mausstammes deutliche Veränderungen im Bereich des Cerebellums.

Insgesamt zeigten also die Gehirne beider Wildtyp-Mausstämme über den gesamten Beobachtungszeitraum eine stärkere Vakuolisierung als die der tga20-Mäuse. Innerhalb der Wildtyp-Mausstämme wiederum waren die Gehirne der CD-1-Mäuse etwas stärker vakuolisiert als die der C57/Bl6-Mäuse. Bezüglich der verschiedenen Regionen war das Cerebellum nur bei den CD-1-Mäusen bereits präklinisch und mit Einsetzen der klinischen Symptome hochgradig betroffen. Im Bereich des Cerebrums/Diencephalons wurde bei allen Mausstämmen während des gesamten Krankheitsverlaufs ein Vakuolisierungsgrad von 2 nicht überschritten.

präklinisches Stadium: 3. Zw					frühes klinisches Stadium					spätes klinisches Stadium				
dpi - Tier Nr.		Gehirnregion			dpi - Tier Nr.		Gehirnregion			dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		
		Cb	Hs	Ce/Di			Cb	Hs	Ce/Di			Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1														
90 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	119 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	++	142 - Tier 1		++++	++++	++
" - Tier 2	++	+++	+	+	" - Tier 2	++++	++++	++++	++	" - Tier 2		++++	++++	++
" - Tier 3	+++	+++	++	++	121 - Tier 3	++++	++++	++++	++	" - Tier 3		++++	++++	++
92 - Tier 4	++	++++	++	++	" - Tier 4	++++	++++	++++	++	149 - Tier 4		++++	++++	++
Kontrolle 92 - Tier 1	--	--	--	--	Kontrolle 119 - Tier 1	--	--	--	--	Kontrolle 130 - Tier 1		--	--	--
Kontrolle 92 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 119 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 140 - Tier 2		--	--	--
Mausstamm: C57/Bl6														
93 - Tier 1	--	+	+	+	97 - Tier 1	n.a.	+	+	+	149 - Tier 1		+++	+++	++
" - Tier 2	--	++	+	+	" - Tier 2	+/-	++	++	+	157 - Tier 2		++	+++	++
" - Tier 3	--	+	+	+	98 - Tier 3	++	++	++	++	" - Tier 3		++	+++	++
" - Tier 4	+/-	++	++	++	" - Tier 4	+/-	++	++	++	158 - Tier 4		+++	+++	++
Kontrolle 93 - Tier 1	--	--	--	--	Kontrolle 98 - Tier 1	--	--	--	--	Kontrolle 146 - Tier 1		--	--	--
Kontrolle 93 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 98 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 157 - Tier 2		--	--	--
Mausstamm: tga20														
40 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	48 - Tier 1	--	+/-	+/-	+	57 - Tier 1		+/-	++	n.a.
" - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 2	+/-	++	++	+	" - Tier 2		+/-	++	+
41 - Tier 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	49 - Tier 3	+/-	+/-	+/-	-- *	61 - Tier 3		+/-	++	++
42 - Tier 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 4	+/-	+/- *	+/-	-- *	64 - Tier 4		+/-	++ *	+
										62 - Tier 5		++	+++	++
										Kontrolle 61 - Tier 1 1%		--	--	--
					Kontrolle 48 - Tier 1 1%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 61 - Tier 2 1%		--	--	--
					Kontrolle 48 - Tier 2 1%	n.a.	-- *	--	--	Kontrolle 61 - Tier 1		n.a.	-- *	--
Kontrolle 40 - Tier 1	--	--	--	--	Kontrolle 48 - Tier 1					Kontrolle 61 - Tier 2		--	--	--
Kontrolle 40 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 48 - Tier 2	--	--	--	--	Kontrolle 62 - Tier 1		--	--	--

Tabelle 10: Vakuolisierung der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den drei beurteilten Gehirnregionen (Cb = Cerebellum; Hs = Hirnstamm; Ce/Di = Cerebrum/Dienzephalon) nach ic-Inokulation im präklinischen Stadium (3. Zeitwert) sowie im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; * = Lokalisation begrenzt auswertbar

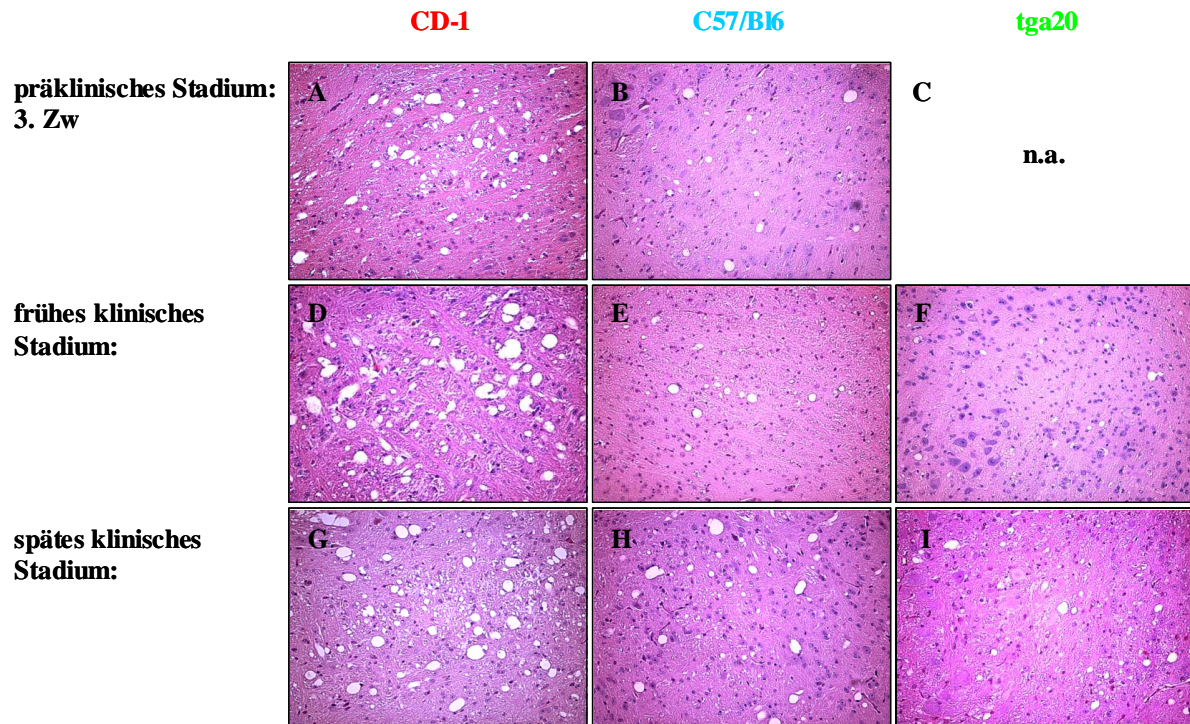


Abbildung 15: Vakuolisierung der Gehirne der drei Mausstämmen (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den unterschiedlichen Krankheitsstadien nach ic-Inokulation (HE-Färbung, Hirnstamm, Vergrößerung: 20x). A: 90 dpi – Tier 3; B: 93 dpi – Tier 4; D: 121 dpi – Tier 4; E: 97 dpi – Tier 2; F: 48 dpi – Tier 2; G: 142 dpi – Tier 3; H: 158 dpi – Tier 4; I: 57 dpi – Tier 2.

4.2.2 Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation)

Nach intraperitonealer Verabreichung von RML konnte im Gehirn einer der vier CD-1-Mäuse des zweiten Zeitwertes bereits präklinisch im Hirnstamm eine gering- bis mittelgradige Vakuolisierung nachgewiesen werden (91 dpi - Tier 2). In den Proben der beiden anderen Mausstämmen waren, wie auch nach ic-Inokulation, zu den beiden frühesten Zeitpunkten des präklinischen Stadiums keine TSE-spezifischen Vakuolen feststellbar (1. Zw: Ergebnisse nicht gezeigt; 2. Zw: Siehe Kapitel 4.4.2.1, Tab. 21, Abb. 43). Ab dem dritten präklinischen Zeitwert ergab sich für die CD-1-Mäuse ein ähnliches histologisches Bild wie nach ic-Inokulation. Cerebellum und Hirnstamm waren mit Vakuolisierungsgraden von 3 bzw. 4 am deutlichsten betroffen (Tab. 11, Abb. 16 A) und somit stärker vakuolisiert als die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse, bei denen jedoch im Gegensatz zu ic-Inokulation hier bereits präklinisch das Kleinhirn teilweise mitbetroffen war (Tab. 11, Abb. 16 B). In den Gehirnen der tga20-Mäuse waren zu allen präklinischen Zeitwerten wiederum keine TSE-spezifischen Vakuolen nachweisbar (Tab. 11, Abb. 16 C).

Im weiteren Verlauf waren mit einsetzenden Symptomen in den Gehirnen der tga20-Mäuse bis auf eine Ausnahme, die eine gering- bis mittelgradige Ausprägung von Läsionen im Hirnstamm zeigte, ebenfalls keine TSE-spezifischen Vakuolen nachweisbar (Tab. 11, Abb. 16 F). Wiederum wiesen die Gehirne aller Wildtyp-Mäuse dagegen spongiforme Läsionen in allen untersuchten Bereichen des Gehirns auf (Tab. 11, Abb. 16). Die Gehirne der CD-1-Mäuse waren in Cerebellum und Hirnstamm mit teilweise hochgradiger Ausbildung von Vakuolen wieder etwas stärker vakuolisiert als die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse, bei denen im Vergleich zu den ic-inokulierten C57/Bl6-Tieren das Kleinhirn jedoch häufiger und stärker betroffen war (Tab. 11).

In den Gehirnen kranker Wildtyp-Mäuse im späten Stadium von Scrapie waren bezüglich der Lokalisation und des Vakuolisierungsgrades keine auffallenden Unterschiede zur ic-Inokulation erkennbar (Tab. 10 und 11). Die stärksten Läsionen zeigten sich erneut im Kleinhirn sowie im Bereich des Hirnstammes, während die Regionen des Cerebrums/Diencephalons zwar ebenfalls immer, jedoch weniger stark, mitbetroffen waren. Die Gehirne der tga20-Mäuse waren im Vergleich zu ic-inokulierten Tieren dieses Mausstammes insgesamt etwas schwächer vakuolisiert. Dies zeigte sich vor allem im Cerebellum und in den Bereichen des Cerebrums/Diencephalons, in denen bei keinem bzw. nur bei einem der vier Tiere geringgradige spongiforme Läsionen nachweisbar waren (Tab. 11, Abb. 16).

Wie bereits nach ic-Inokulation waren auch nach ip-Inokulation nur bei den beiden Wildtyp-Mausstämmen in einem präklinischen Stadium von Scrapie Vakuolen nachweisbar. Die Gehirne der transgenen Mäuse wiesen auch nach ip-Inokulation eine schwächere Vakuolisierung des Gehirns auf als die beiden Wildtyp-Mausstämme und auch als ic- inokulierte tga20-Mäuse (Tab. 10 und 11).

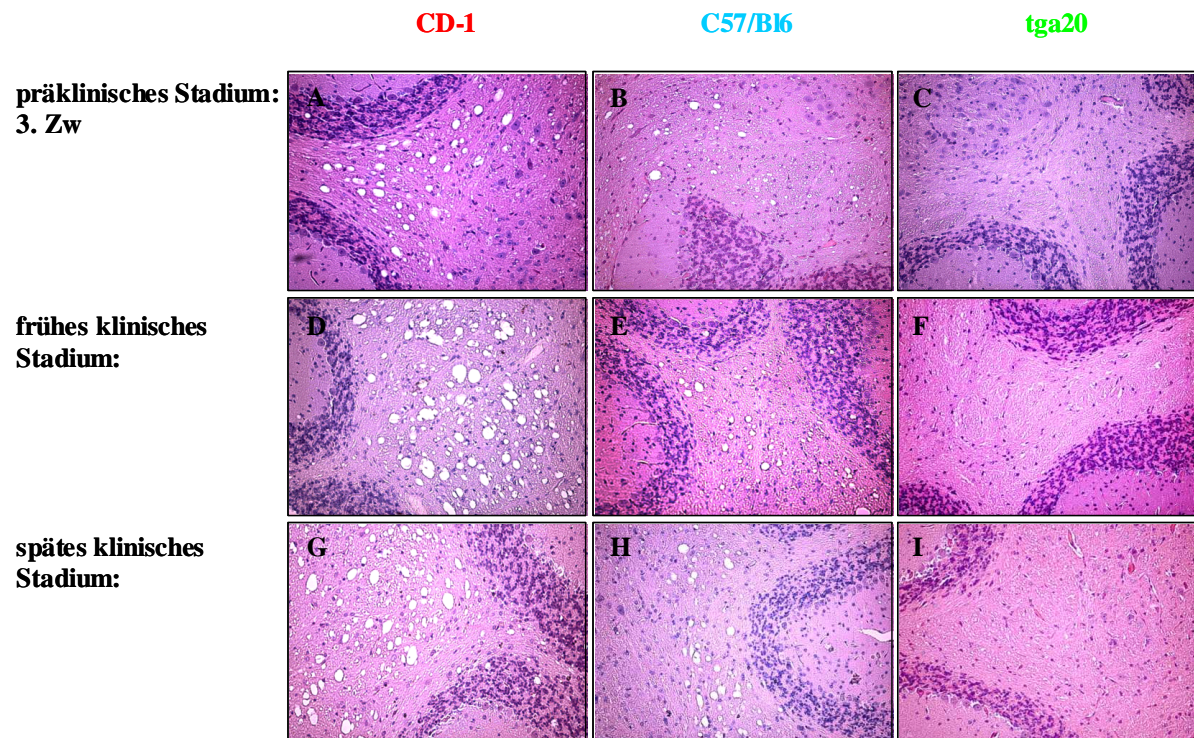


Abbildung 16 : Vakuolisierung der Gehirne der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den unterschiedlichen Krankheitsstadien nach ip-Inokulation (HE-Färbung, Kleinhirn, Vergrößerung: 20x). A: 168 dpi – Tier 3; B: 162 dpi – Tier 4; C: 62 dpi – Tier 2; D: 175 dpi – Tier 2; E: 182 dpi – Tier 4; F: 77 dpi – Tier 4; G: 224 dpi – Tier 4; H: 204 dpi – Tier 3; I: 80 dpi – Tier 1.

präklinisches Stadium: 3. Zw				frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium				
dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		
		Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1												
168 - Tier 1		+++	+++	++	168 - Tier 1	+++	+++	++	188 - Tier 1	+++	+++	++
" - Tier 2		++++	++++	++	175 - Tier 2	++++	++++	++	" - Tier 2	++++	++++	++
" - Tier 3		+++	++++	++	" - Tier 3	++++	++++	++	195 - Tier 3	++++	++++	++
					" - Tier 4	+++	++++	++	224 - Tier 4	++++	++++	++
									Kontrolle 190 - Tier 1	--	--	--
									Kontrolle 190 - Tier 2	--	--	--
Kontrolle 168 - Tier 1		--	--	--					Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 168 - Tier 2		--	-- *	--	Kontrolle 175 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: C57/Bl6												
162 - Tier 1		n.a.	++	++	162 - Tier 1	+++	+++	++	195 - Tier 1	++++	++++	++
" - Tier 2		+/-	+++	+	182 - Tier 2	n.a.	+++	++ *	204 - Tier 2	n.a.	+++	++
" - Tier 3		++	++	++	" - Tier 3	++ *	+++	++	" - Tier 3	+++	+++	++
" - Tier 4		++	++	++	" - Tier 4	++	+++	+	211 - Tier 4	++	+++	++
									212 - Tier 5	+++	+++	++
Kontrolle 162 - Tier 1		--	--	--	Kontrolle 182 - Tier 1	--	--	--	Kontrolle 200 - Tier 1	--	--	-- *
Kontrolle 162 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 182 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 208 - Tier 2			
Mausstamm: tga20												
62 - Tier 1		--	--	-- *	76 - Tier 1	--	+/-	--	80 - Tier 1	--	+	-- *
" - Tier 2		--	+/-	+/- *	" - Tier 2	--	-- *	--	" - Tier 2	-- *	++	--
" - Tier 3		--	+/-	+/- *	77 - Tier 3	--	++	--	81 - Tier 3	+/-	++	+
" - Tier 4		--	--	--	" - Tier 4	--	+/-	+/-	84 - Tier 4	+/-	++	--
Kontrolle 61 - Tier 1		n.a.	-- *	--								
Kontrolle 61 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 76 - Tier 1	n.a.	--	--	Kontrolle 84 - Tier 1	n.a.	--	--
Kontrolle 62 - Tier 1		--	--	--	Kontrolle 76 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 84 - Tier 2	--	--	--

Tabelle 11: Vakuolisierung der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den drei beurteilten Gehirnregionen nach ip-Inokulation in den Krankheitsstadien a (3. Zeitwert), b und c. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

4.2.3 Orale Inokulation

Nach oraler Inokulation konnten im präklinischen Stadium in den Gehirnen sowohl der CD-1- als auch der tga20-Mäuse keine TSE-spezifischen Vakuolen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gehirn einer C57/Bl6-Maus, die nach 212 dpi (Tier 2) ohne klinische Symptome getötet wurde, zeigten sich jedoch deutliche TSE-typische Vakuolen in allen untersuchten Regionen. Dabei waren die Lokalisation und der Grad der Läsionen vergleichbar mit den präklinischen Veränderungen der C57/Bl6-Mäuse nach ip-Inokulation (Tab. 11 und Kapitel 4.4.3.1, Abb. 48).

Mit beginnenden klinischen Symptomen nach oraler Gabe sowohl von 1%igem als auch von 10%igem Gehirnhomogenat zeigten die Gehirne der CD-1-Wildtyp-Mäuse ein vergleichbares histologisches Bild wie nach ic- und ip-Inokulation (Tab. 12). Alle untersuchten Gehirnregionen waren bereits ähnlich stark betroffen wie im späten klinischen Stadium der Erkrankung. Hirnstamm und Cerebellum zeigten erneut die deutlichsten Läsionen. Für die Beurteilung der Vakuolisierung in den Gehirnen der C57/Bl6-Mäuse stand für dieses klinische Stadium nur ein Tier zur Verfügung. Die Veränderungen waren vergleichbar mit denen nach ip-Inokulation (Tab. 12, Abb. 17 B).

Im Gegensatz zu den beiden Wildtyp-Mausstämmen waren die Gehirne der tga20-Mäuse wie nach den beiden vorangegangenen Inokulationsrouten auch nach oraler Infektion mit Einsetzen der Symptome schwächer vakuolisiert (Tab. 12, Abb. 17 C). Dies zeigte sich vor allem im Kleinhirn und in den Regionen des Cerebrums/Diencephalons, die bis auf eine Ausnahme keine spongiformen Läsionen aufwiesen. Anders als nach ic- und ip-Inokulation waren jedoch bei allen ausgewerteten Tieren, insbesondere im Hirnstamm, TSE-spezifische Vakuolen nachweisbar (Tab. 12).

Im weiteren Krankheitsverlauf zeigten die Gehirne der Wildtyp-Mäuse ebenfalls keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Lokalisation und des Grades der ausgebildeten Läsionen verglichen mit ic- und ip-Inokulation (Tab. 12, Abb. 17 D und E; Abb. 18 A und C). Es bestätigte sich, dass die Gehirne der tga20-Mäuse deutlich geringer vakuolisiert waren als die Gehirne der beiden Wildtyp-Mausstämme (Tab. 12, Abb. 17 D bis F, Abb. 18 A bis D).

frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium			
dpi - Tier Nr.	Gehirnregion			dpi - Tier Nr.	Gehirnregion		
	Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1							
210 - Tier 1 (1%)	+++	++++	++	237 - Tier 1 (1%)	+++	+++	++
" - Tier 2 "	+++	+++	++	257 - Tier 1 "	++++	++++	++
" - Tier 3 "	+++	+++	++	210 - Tier 1 (10%)	++++	++++	++
" - Tier 4 "	++++	++++	++	220 - Tier 2 "	+++	++++	++
175 - Tier 1 (10%)	++++	++++	+	235 - Tier 3 "	+++	+++	++
188 - Tier 2 "	++++	++++	++	260 - Tier 4 "	++++	++++	++
200 - Tier 3 "	++++	++++	++				
215 - Tier 4 "	+++	++++	++				
Kontrolle 190 - Tier 1	--	--	--				
Kontrolle 190 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 237 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: C57/B16							
262 - Tier 1 (1%)	+++	+++	++	226 - Tier 1 (1%)	+++	+++	++
				252 - Tier 1 "	+++	+++	++
				268 - Tier 1 "	+++	+++	++
				Kontrolle 226 - Tier 1	--	--	--
Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--
Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--
Mausstamm: tga20							
142 - Tier 1 (1%)	--	++	--	139 - Tier 1 (1%)	+	++	--
153 - Tier 2 "	--	+	+	145 - Tier 2 "	--	++	--
75 - Tier 1 (10%)	--	++	--	95 - Tier 1 (10%)	+	++	-- *
140 - Tier 2 "	--	++	--	109 - Tier 2 "	--	++	--
145 - Tier 3 "	--	++	--	137 - Tier 3 "	--	++	+
Kontrolle 76 - Tier 1	n.a.	--	--				
Kontrolle 76 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 90 - Tier 1	--	--	--
Kontrolle 142 - Tier 1	--	--	--	Kontrolle 90 - Tier 2	--	--	--
Kontrolle 153 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 142 - Tier 1	--	--	--

Tabelle 12: Vakuolisierung der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/B16 und tga20) in den drei beurteilten Gehirnregionen nach oraler Inokulation im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

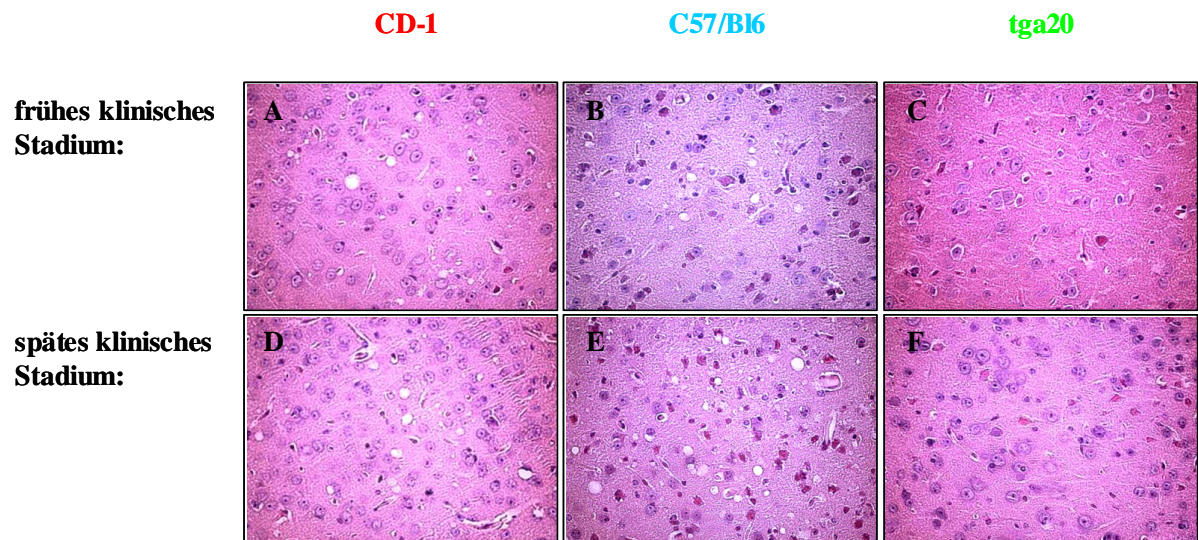


Abbildung 17: Vakuolisierung der Gehirne der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im frühen und späten klinischen Stadium von Scrapie nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirnhomogenat (HE-Färbung, Cortex, Vergrößerung: 40x). A: 210 dpi – Tier 3; B: 262 dpi – Tier 1; C: 142 dpi – Tier 1; D: 237 dpi – Tier 1; E: 252 dpi – Tier 1; F: 145 dpi – Tier 2.

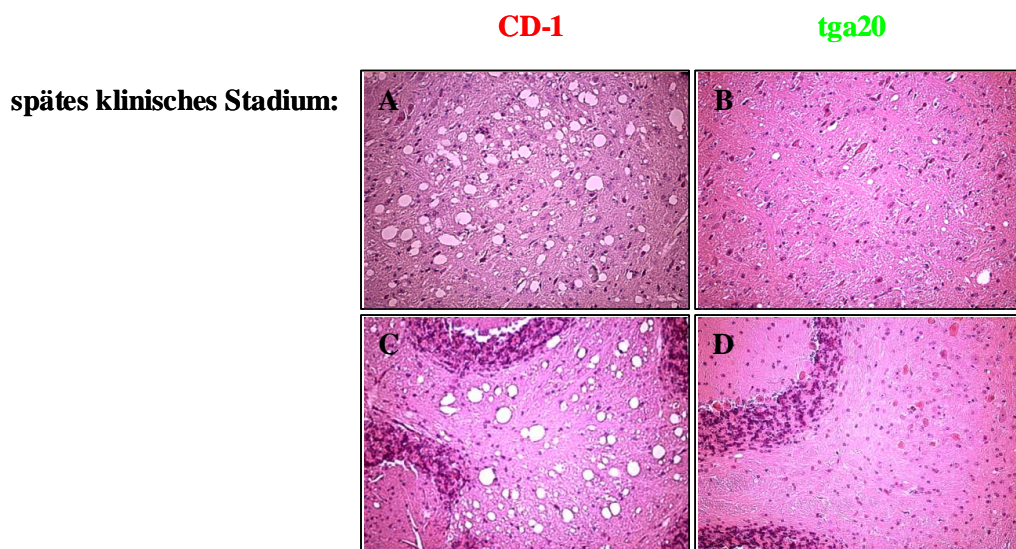


Abbildung 18: Vakuolisierung der Gehirne von CD-1- und tga20-Mäusen im späten klinischen Krankheitsstadium nach oraler Inokulation mit 10%igem Gehirnhomogenat. A und B: Hirnstamm (Vergrößerung: 20x). C und D: Cerebellum (Vergrößerung: 20x). A und C: 220 dpi – Tier 2; B und D: 109 dpi – Tier 2.

4.2.4 Zusammenfassung

Bei allen drei Inokulationsrouten waren die Gehirne der tga20-Mäuse während des gesamten Krankheitsverlaufs bei gleicher Ausprägung der klinischen Symptome schwächer vakuolisiert als die der beiden Wildtyp-Mausstämme.

Innerhalb der beiden Wildtyp-Mausstämme zeigten dabei die Gehirne der CD-1-Mäuse etwas stärker ausgebildete Vakuolen als die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse. Das Kleinhirn und der Hirnstamm wiesen jeweils die stärksten Veränderungen auf. Innerhalb des CD-1-Mausstammes konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Inokulationswegen bezüglich der Lokalisation und der Stärke der Läsionen festgestellt werden. Dagegen waren die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse nach ip- und oraler Inokulation in den Regionen des Kleinhirns und des Hirnstammes mit Einsetzen der ersten Symptome etwas stärker betroffen als nach ic-Inokulation. Bei beiden Wildtyp-Mausstämmen war bereits präklinisch eine deutliche Ausbildung von Vakuolen erkennbar.

Im Gegensatz dazu traten spongiforme Läsionen in den Gehirnen der tga20-Mäuse nach allen drei Inokulationswegen erst mit Einsetzen der klinischen Symptome auf. Es zeigte sich außerdem, dass bei Tieren im späten klinischen Krankheitsstadium nur im Bereich des Hirnstammes regelmäßig TSE-spezifische Vakuolen nachweisbar waren, während in den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse alle drei Bereiche mitbetroffen waren. Bezüglich der verschiedenen Inokulationsrouten waren nach den beiden peripheren Wegen die Regionen des Cerebrums/Diencephalons seltener und schwächer betroffen als nach ic-Inokulation.

Eine vergleichende Darstellung der Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen im Gehirn zeigen die folgenden „Gehirnkarten“ von Tieren der drei Mausstämme im späten klinischen Stadium von Scrapie (Abb. 19 A bis C).

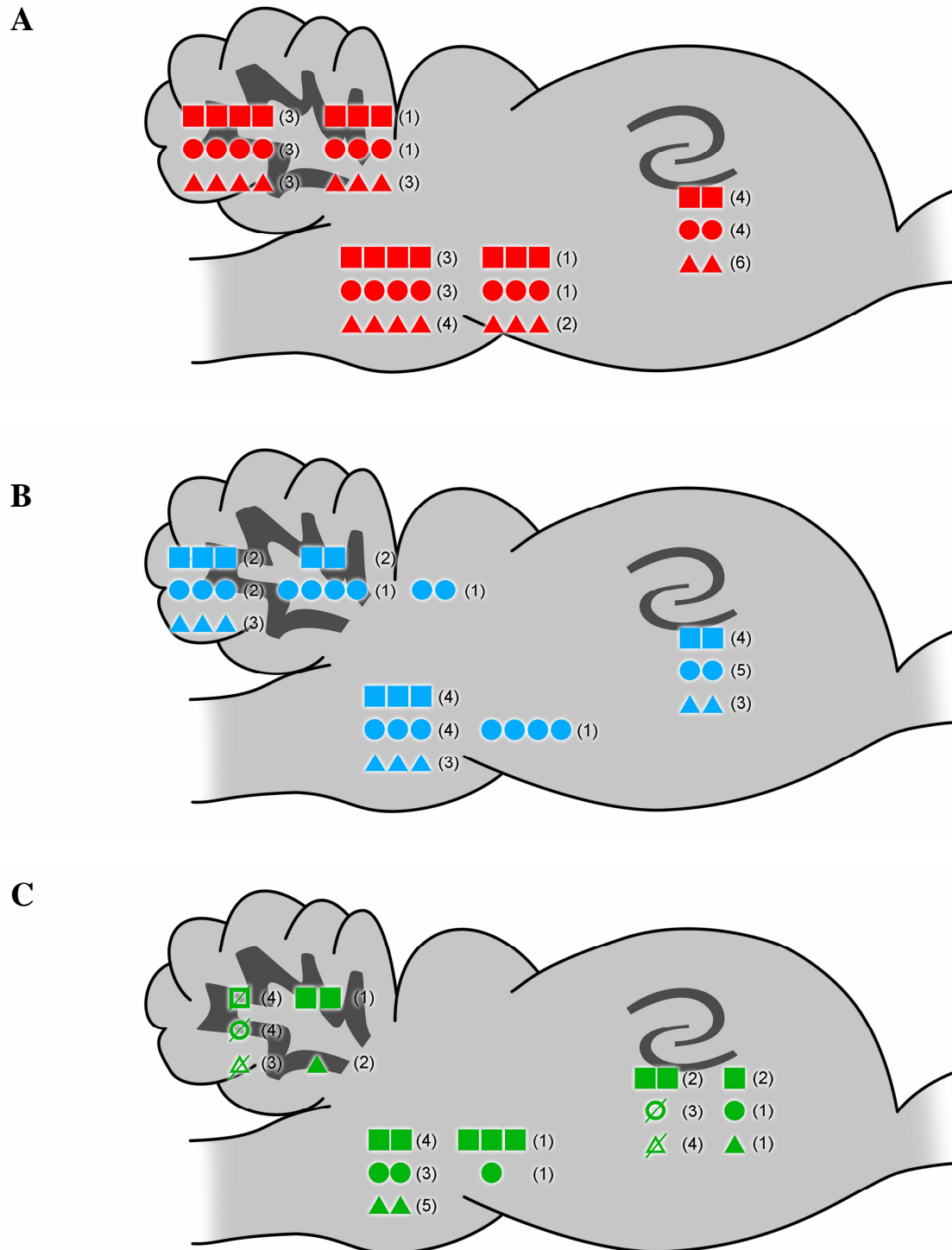


Abbildung 19: „Gehirnkarten“ drei Mausstämmen (A: CD-1; B: C57/Bl6; C: tga20) im späten klinischen Krankheitsstadium: Vakuolisierungsgrade in den drei untersuchten Gehirnregionen: Viereck = ic-Inokulation: \square = negativ/fraglich; \blacksquare = Grad 1; $\blacksquare\blacksquare$ = Grad 2; $\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ = Grad 3; $\blacksquare\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ = Grad 4. Kreis = ip-inokulation: \emptyset = negativ/fraglich; \bullet = Grad 1; $\bullet\bullet$ = Grad 2; $\bullet\bullet\bullet$ = Grad 3; $\bullet\bullet\bullet\bullet$ = Grad 4. Dreieck = orale Inokulation: \triangle = negativ/fraglich; \blacktriangle = Grad 1; $\blacktriangle\blacktriangle$ = Grad 2; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ = Grad 3; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ = Grad 4; Anzahl der Tiere jeweils in Klammern angegeben.

4.3 Beurteilung der Astrozytose

Im Gehirn finden sich neben Nervenzellen mehrere Arten von Gliazellen. Die größte Gruppe der Gliazellen bilden die Astrozyten oder Sternzellen. Sie besitzen zahlreiche, radiär vom Zellkörper verlaufende Fortsätze und erfüllen grundlegende Funktionen beim Schutz und Stoffwechsel des zentralen Nervensystems. So sorgen Astrozyten für die Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes und bilden mit ihren Fortsätzen Grenzmembranen zur Gehirnoberfläche und zu den Blutgefäßen. Sie sind somit auch an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Als Marker für Astrozyten dient das Intermediärfilament Glial Acidic Fibrillary Protein (GFAP).

Eine krankhafte Vermehrung der Astrozyten wird als Astrozytose bezeichnet. Die Ausbildung einer Astrozytose im Gehirn ist ein unspezifischer, aber regelmäßiger Befund bei Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien. Sie zeigt sich in einer Erhöhung der Zellzahl und in einer Größenzunahme der einzelnen Astrozyten. Dementsprechend ist auch die Bildung des GFAP verstärkt. Die Menge des im Gehirn exprimierten GFAP wurde in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie (IHC) sowie RT-PCR und Northern Blothybridisierung quantifiziert und die Ausbildung einer Astrozytose nach den drei Inokulationswegen (intrazerebral, intraperitoneal und oral) sowohl innerhalb eines Mausstammes als auch zwischen den verschiedenen Mausstämmen (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im Verlauf von Scrapie verglichen.

Für die immunhistochemische Untersuchung wurde je eine Gehirnhälfte mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Der immunhistochemische Nachweis der Astrozyten wurde am Sagittalschnitt der Gehirne mittels eines Primär-Antikörpers gegen das Glial Acidic Fibrillary Protein (GFAP) durchgeführt. Nach Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpers erfolgte die Markierung mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB). GFAP-positiv markierte Astrozyten stellten sich dunkelbraun dar.

Die zweite Gehirnhälfte wurde in RNAlater fixiert. Ein kleines kraniales Stück dieser Gehirnhälfte wurde für die Western Blot Analyse zurückbehalten. Aus dem übrigen Gehirn wurde die Gesamtzell-RNA isoliert. Mittels semi-quantitativer RT-PCR und Northern Blothybridisierung wurde die GFAP-Genexpression beurteilt.

Als Vergleichs-Gen („housekeeping“-Gen) diente in der PCR Analyse die Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse. Es wird, ähnlich wie β -Aktin, als Vergleichswert eingesetzt, da seine Expression in der Zelle relativ konstant ist. Von den einzelnen Proben wurden die nach RT-PCR erhaltenen Signalintensitä-

ten der GFAP- und GAPDH-RNA densitometrisch vermessen und das GFAP/GAPDH-Verhältnis berechnet.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der PCR wurden ausgewählte RNAs zusätzlich nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Northern Blothybridisierung getestet. Da nach den Ergebnissen der IHC und PCR Analyse beide Wildtyp-Mausstämme ähnliche Verläufe der Erkrankung nach den verschiedenen Inokulationen aufwiesen, wurden nach ic- und ip-Inokulation für die Untersuchungen mittels Northern Blothybridisierung stellvertretend für beide Wildtyp-Mausstämme nur RNAs von den Gehirnen der CD-1-Mäuse mit denen der transgenen tga20-Mäuse verglichen. Aufgrund der geringen Anzahl erkrankter Tiere nach oraler Inokulation wurden zur Beurteilung dieses Inokulationsweges allerdings neben CD-1- teilweise auch C57/Bl6-Mäuse ausgewertet. Nach densitometrischer Ausmessung der Signale und Vergleich der Signalstärken der GFAP-spezifischen mRNA mit der 18S rRNA als RNA-Standard wurde das GFAP/18S-Verhältnis berechnet. Die 18S rRNA dient, ebenso wie β -Aktin und GAPDH, als Vergleichswert, da ihre Expression in der Zelle auch in den unterschiedlichsten Versuchsbedingungen nur eine sehr geringe Varianz zeigt.

In der immunhistochemischen Untersuchung wurden sämtliche Kontrolltiere ausgewertet. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten Mäusen und den Tieren, die mit Gehirnhomogenat von gesunden Mäusen intrazerebral inokuliert wurden. In der RT-PCR und Northern Blot Analyse kamen einzelne Kontrolltiere zur Auswertung. Auch hier waren keine Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen feststellbar. Insgesamt wurden mittels PCR vierunddreißig Gehirne von Kontrolltieren untersucht. Die Analyse ergab bei allen Tieren ein GFAP/GAPDH-Verhältnis von $\leq 1,0$ (Ergebnisse nicht gezeigt). In den Gehirnen der CD-1-Mäuse wurde ein Mittelwert der GFAP/GAPDH Ratio von 0,92 gemessen. Der Mittelwert der Kontroll-Gehirne von C57/Bl6-Mäusen lag bei 0,94 und von tga20-Mäusen bei 1,0. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine GFAP/GAPDH Ratio von $> 1,0$ als eine erhöhte GFAP-Transkription gewertet.

4.3.1 Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)

4.3.1.1 Immunhistochemie (IHC)

Im präklinischen Stadium von Scrapie ergab sich in den Gruppen des ersten Zeitwertes kein Hinweis auf eine Astrozytose (Ergebnisse nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf dieses Krankheitsstadiums konnte zunächst bei einzelnen Tieren aller drei Mausstämme eine geringgradige Aktivierung der Astrozyten im Gehirn nachgewiesen werden bis schließlich zum dritten präklinischen Zeitwert alle Tiere der beiden Wildtyp-Mausstämme eine deutlich

erhöhte Astrozytenzahl aufwiesen (Tab. 13, Abb. 20). Dabei war die Astrozytose bei den C57/Bl6-Mäusen (Mw 2 der inokulierten Tiere = 12,5; Mw 2 der Kontrolltiere = 5,4) weniger stark ausgebildet als in den Gehirnen der CD-1-Mäuse, die mit einem Mw 2 von 19,9 im Vergleich zu einem Mw 2 von 6,8 bei den Kontrolltieren bereits präklinisch eine ähnlich stark ausgebildete Astrozytose aufwiesen wie im späten klinischen Krankheitsstadium (Mw 2 = 20,4) (Tab. 13, Abb. 20). Wie bei der Beurteilung der Vakuolisierung bereits beschrieben, konnten die histologischen Proben des dritten präklinischen Zeitwertes von tga20-Mäusen aufgrund einer fehlerhaften Einbettung nicht ausgewertet werden.

Mit dem Einsetzen der ersten Scrapie-spezifischen Symptome zeigten sich, wie bereits beim dritten Zeitwert des präklinischen Stadiums, in allen untersuchten Gehirnen der beiden Wildtyp-Mausstämme deutlich erhöhte Astrozytenzahlen (Tab. 13, Abb. 20). Im Gegensatz dazu war bei den tga20-Mäusen nur in drei der vier untersuchten Gehirne eine leichte Astrozyten-Aktivierung erkennbar (Tab. 13). Der Mittelwert lag somit nur geringgradig über dem Wert der Kontrolltiere (Abb. 20).

Im späten klinischen Krankheitsstadium war schließlich auch in allen untersuchten Gehirnen der tga20-Mäuse eine deutliche Erhöhung der Astrozytenzahl erkennbar. Mit einem Mw 2 von 13 lag diese jedoch deutlich unter den Werten der beiden Wildtyp-Mausstämme, die mit Mittelwerten von 20,4 (CD-1) und 19,2 (C57/Bl6) stark ausgebildete Astrozytosen in den Gehirnen aufwiesen (Tab. 13, Abb. 20). Nach intrazerebraler Inokulation konnte also im späten Stadium von Scrapie bei den Tieren aller drei Mausstämme eine Astrozytose beobachtet werden (Tab. 13, Abb. 20 und 21). Die Erhöhung der Astrozytenzahl in den Gehirnen der tga20-Mäuse war dabei allerdings wesentlich niedriger als in den Gehirnen der beiden Wildtyp-Mausstämme.

präklin. Stadium: 2. Zw			präklin. Stadium: 3. Zw			frühes klinisches Stadium			spätes klinisches Stadium		
dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte	
	Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2
Mausstamm: CD-1											
62 - Tier 1	9,5		90 - Tier 1	n.a.		119 - Tier 1	n.a.		142 - Tier 1	17,8	
" - Tier 2	n.a.		" - Tier 2	14,8		" - Tier 2	21,5		" - Tier 2	22,8	
" - Tier 3	11,5		" - Tier 3	21,5		121 - Tier 3	25		" - Tier 3	22	
" - Tier 4	8,5	9,8	92 - Tier 4	23,3	19,9	" - Tier 4	18,3	21,6	149 - Tier 4	19	20,4
Kontrolle 62 - Tier 1 1%	9,3										
Kontrolle 62 - Tier 2 1%	n.a.										
Kontrolle 62 - Tier 1	6,5		Kontrolle 92 - Tier 1	6,5		Kontrolle 119 - Tier 1	4,5		Kontrolle 130 - Tier 1	8	
Kontrolle 62 - Tier 2	5,5	7,1	Kontrolle 92 - Tier 2	7	6,8	Kontrolle 119 - Tier 2	9,3	6,9	Kontrolle 140 - Tier 2	8	8
Mausstamm: C57/Bl6											
61 - Tier 1	10,8		93 - Tier 1	11,3		97 - Tier 1	14,5		149 - Tier 1	18,5	
" - Tier 2	8		" - Tier 2	14,8		" - Tier 2	13,5		157 - Tier 2	16,5	
" - Tier 3	6,8		" - Tier 3	11,3		98 - Tier 3	12		" - Tier 3	20,5	
" - Tier 4	5	7,7	" - Tier 4	12,5	12,5	" - Tier 4	12,8	13,2	158 - Tier 4	21,3	19,2
Kontrolle 61 - Tier 1 1%	3,5										
Kontrolle 61 - Tier 2 1%	3,5										
Kontrolle 62 - Tier 1	4,5		Kontrolle 93 - Tier 1	6		Kontrolle 98 - Tier 1	4,3		Kontrolle 146 - Tier 1	8	
Kontrolle 62 - Tier 2	3,5	3,8	Kontrolle 93 - Tier 2	4,8	5,4	Kontrolle 98 - Tier 2	4,5	4,4	Kontrolle 157 - Tier 2	3,3	5,7
Mausstamm: tga20											
									57 - Tier 1	n.a.	
20 - Tier 1	5,5		40 - Tier 1	n.a.		48 - Tier 1	9,3		57 - Tier 2	14,8	
" - Tier 2	12,8		" - Tier 2	n.a.		" - Tier 2	13,5		61 - Tier 3	13,5	
" - Tier 3	5,8		41 - Tier 3	n.a.		49 - Tier 3	4,8		64 - Tier 4	10,5	
" - Tier 4	7	7,8	42 - Tier 4	n.a.	n.a.	" - Tier 4	8,5	9	62 - Tier 5	13	13
									Kontrolle 61 - Tier 1 1%	4,8	
Kontrolle 20 - Tier 1 1%	7					Kontrolle 48 - Tier 1 1%	n.a.		Kontrolle 61 - Tier 2 1%	5,5	
Kontrolle 20 - Tier 2 1%	4,8					Kontrolle 48 - Tier 2 1%	7,5		Kontrolle 61 - Tier 1	3,3	
Kontrolle 20 - Tier 1	5,3		Kontrolle 40 - Tier 1	3,8		Kontrolle 48 - Tier 1	n.a.		Kontrolle 61 - Tier 2	3	
Kontrolle 20 - Tier 2	6	5,8	Kontrolle 40 - Tier 2	4	3,9	Kontrolle 48 - Tier 2	3,3	5,4	Kontrolle 62 - Tier 1	5,3	4,4

Tabelle 13: Auszählung der Astrozyten in den Gehirnen der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im präklinischen Stadium (2. und 3. Zw) sowie im frühen und späten klinischen Stadium nach ic-Inokulation. Mw1 = Mittelwert aus den vier Gehirnregionen pro Tier; Mw2 = Mittelwert aus den einzelnen Tieren (Mw1) pro Zeitwert. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar.

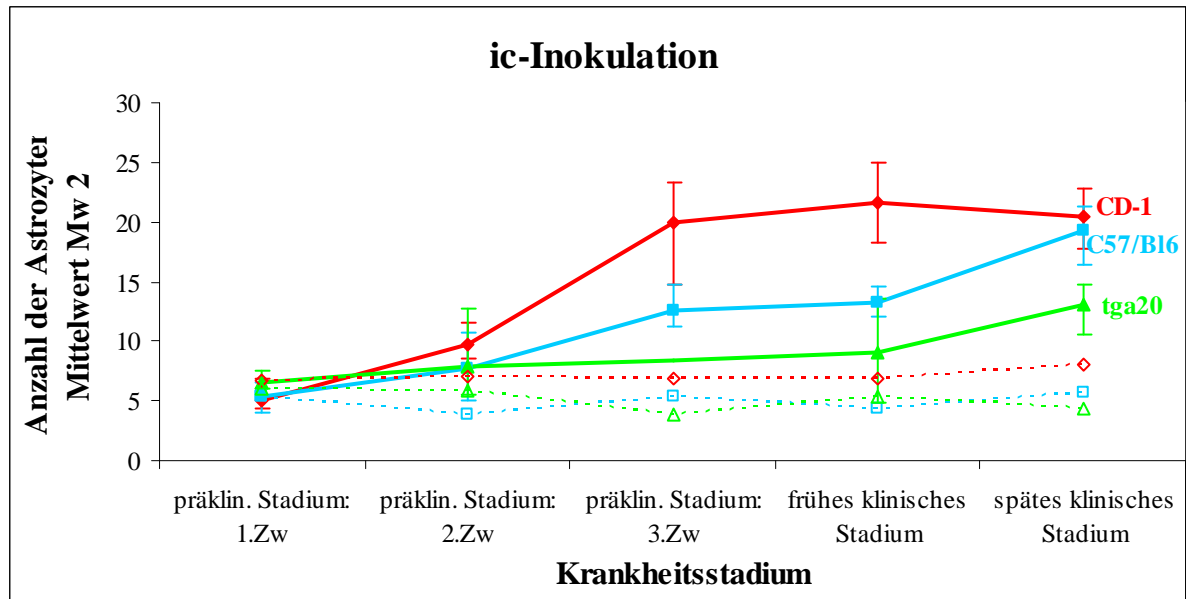


Abbildung 20: Mittelwerte Mw 2 der gezählten Astrozyten in den Gehirnen der verschiedenen Mausstämme (CD-1, C57/B16 und tga20) nach ic-Inokulation. Durchgezogene Linien = inokulierte Tiere; gestrichelte Linien = Kontrolltiere; rot = CD-1-Mäuse; blau = C57/B16-Mäuse, grün = tga20-Mäuse. Zw = Zeitwert.

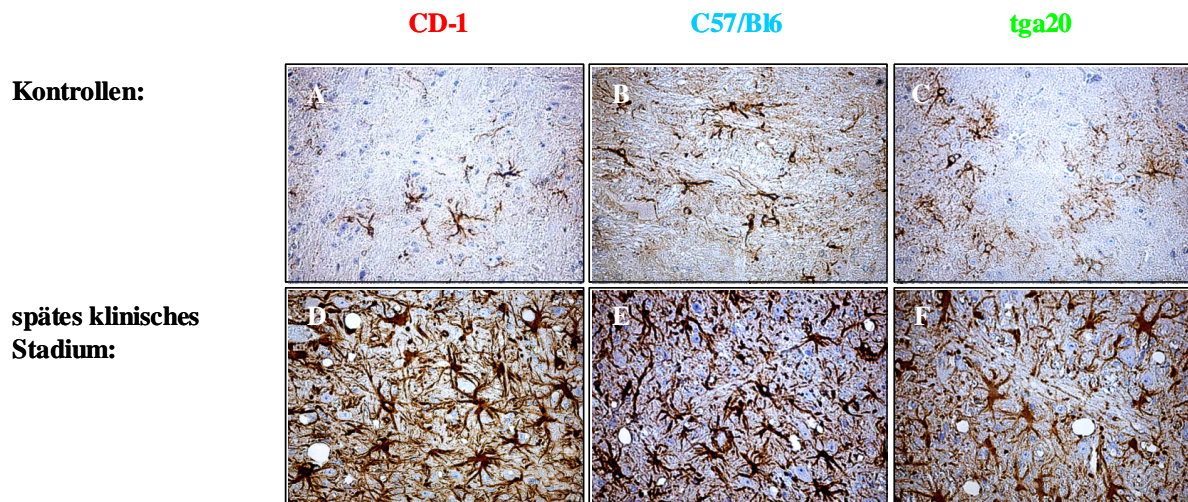


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis des GFAP im Bereich des Hirnstammes nach ic-Inokulation (Vergrößerung: 40x). A–C = Kontrolltiere. D–F = Tiere im späten klinischen Krankheitsstadium (D: 149 dpi – Tier 4; E: 158 dpi – Tier 4; F: 62 dpi – Tier 5).

4.3.1.2 RT-PCR

Analog zu dem Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung konnte zum frühesten Zeitwert des präklinischen Stadiums keine erhöhte Transkription des GFAP-Gens in den untersuchten Gehirnen beobachtet werden (CD-1: Ergebnisse nicht gezeigt; C57/B16- und tga20-Mäuse: Abb. 22 und 23). Bereits zum zweiten Zeitwert dieses Stadiums wies jeweils ein Tier der beiden Wildtyp-Mausstämme eine verstärkte GFAP-Genexpression im Gehirn

auf (Tab. 14). In der Gruppe der CD-1-Mäuse handelte es sich jedoch nicht um eines der Tiere, das auch in der immunhistochemischen Markierung eine leichte Erhöhung der Astrozytenzahl zeigte (Tab. 13 und 14). Die untersuchten Gehirne in der Gruppe der tga20-Mäuse wiesen keinen Anstieg des GFAP/GAPDH-mRNA-Verhältnisses zu diesem Zeitpunkt auf (Tab. 14, Abb. 23). Insgesamt wurde zu diesem relativ frühen Zeitpunkt sowohl in der immunhistochemischen Auswertung als auch mittels PCR Analyse nur bei einzelnen Tieren der drei Mausstämme eine geringe Zunahme der Astrozytenzahl bzw. eine geringgradig verstärkte Transkription von GFAP nachgewiesen. Dabei waren die Ergebnisse der beiden Nachweismethoden nicht in allen Fällen einheitlich.

Für den dritten präklinischen Zeitwert wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung der Wildtyp-Mäuse mittels RT-PCR bestätigt. In allen untersuchten Wildtyp-Gehirnen wurde eine Zunahme der GFAP-Transkription gemessen (Tab. 14, Abb. 22). Bezüglich der transgenen tga20-Mäuse konnten nun erste Ergebnisse für diesen Zeitwert gezeigt werden. Lediglich das Gehirn eines der vier untersuchten Tiere (41 – Tier 3) wies eine erhöhte GFAP-Transkription auf. Es zeigte sich somit keine erhöhte Expression des Proteins für die Gruppe dieses Zeitwertes insgesamt (Tab. 14, Abb. 23).

Im weiteren Verlauf ging mit Einsetzen der ersten TSE-spezifischen Symptome bei allen Wildtyp-Mäusen die mittels Immunhistochemie nachgewiesene Astrozytose mit einer deutlichen Erhöhung der GFAP-Genexpression einher (Tab. 14, Abb. 22). Die Gehirne der CD-1-Mäuse wiesen mit einem Mittelwert von 1,44 eine stärkere Induktion der GFAP-Genexpression auf als die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse (Mittelwert: 1,27). Für die tga20-Mäuse ergab sich bei keinem der vier Tiere eine erhöhte GFAP-Genexpression (Tab. 14, Abb. 23). Die bei einzelnen Tieren dieser Gruppe nachgewiesene geringgradige Erhöhung der Astrozytenzahl konnte demnach nicht bestätigt werden. Auch hier zeigte sich, dass der Nachweis des Proteins und die Analyse der Genexpression im Fall einer deutlichen Erhöhung der GFAP-Transkription einheitliche Ergebnisse liefern, während sich bei geringgradigen Veränderungen abweichende Resultate mit den verschiedenen Methoden ergaben.

Im späten klinischen Stadium von Scrapie bestätigten sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung auch nach der RT-PCR Analyse für alle drei Mausstämme. Alle ausgewerteten Proben wiesen einen Anstieg der GFAP-Genexpression auf (Tab. 14, Abb. 22 und 23). Eine Ausnahme bildete eine tga20-Maus (61 - Tier 3), bei der die erhöhte Astrozytenzahl nicht mit einem Anstieg der GFAP-Genexpression korrelierte. Die errechneten Mittelwerte zeigten einen deutlichen Anstieg der GFAP-Transkription (CD-1: 1,24; C57/Bl6:

1,45; tga20: 1,26; Tab. 14), der sich auch in einer signifikanten Erhöhung der Astrozytenzahlen darstellte (Tab. 13, Abb. 20 und 21).

Beim direkten Vergleich von CD-1 und tga20-Mäusen zeigte sich hingegen keine Übereinstimmung der Ergebnisse der RT-PCR und der IHC insofern, als dass beide Mausstämme eine vergleichbare GFAP-Transkription aufwiesen, während sich nach immunhistochemischer Auswertung deutlich niedrigere Astrozytenzahlen für die transgenen Tiere im Vergleich zu den CD-1-Mäusen ergaben.

präklin. Stadium: 2. Zw				präklin. Stadium: 3. Zw				frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium			
dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw	
Mausstamm: CD-1															
62 - Tier 1	1			90 - Tier 1	1,22			119 - Tier 1	keine RNA			142 - Tier 1	1,38		
" - Tier 2	1,13			" - Tier 2	1,1			" - Tier 2	keine RNA			" - Tier 2	1,38		
" - Tier 3	0,88			" - Tier 3	keine RNA			121 - Tier 3	1,38			" - Tier 3	1,1		
" - Tier 4	0,89	0,98		92 - Tier 4	1,2	1,17		" - Tier 4	1,5	1,44		149 - Tier 4	1,1	1,24	
Mausstamm: C57/Bl6															
61 - Tier 1	1,13			93 - Tier 1	1,2			97 - Tier 1	1,1			149 - Tier 1	1,3		
" - Tier 2	1			" - Tier 2	1,2			" - Tier 2	1,2			157 - Tier 2	1,63		
" - Tier 3	1			" - Tier 3	1,33			98 - Tier 3	1,5			" - Tier 3	1,44		
" - Tier 4	1	1,03		" - Tier 4	1,33	1,27		" - Tier 4	keine RNA	1,27		158 - Tier 4	1,44	1,45	
Mausstamm: tga20															
20 - Tier 1	1			40 - Tier 1	1			48 - Tier 1	0,88			57 - Tier 1	1,22		
" - Tier 2	1			" - Tier 2	0,86			" - Tier 2	1			57 - Tier 2	1,5		
" - Tier 3	0,9			41 - Tier 3	1,2			49 - Tier 3	1			61 - Tier 3	1		
" - Tier 4	0,8	0,93		42 - Tier 4	1	1,02		" - Tier 4	1	0,97		64 - Tier 4	1,25		
												62 - Tier 5	1,33	1,26	

Tabelle 14: GFAP/GAPDH-Verhältnis nach RT-PCR Analyse der RNA aus den Gehirnen von ic-inokulierten Tieren der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im präklinischen Krankheitsstadium (1. und 2. Zw) sowie im frühen und späten klinischen Stadium von Scrapie. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Mw = Mittelwert; Nr. = Nummer.

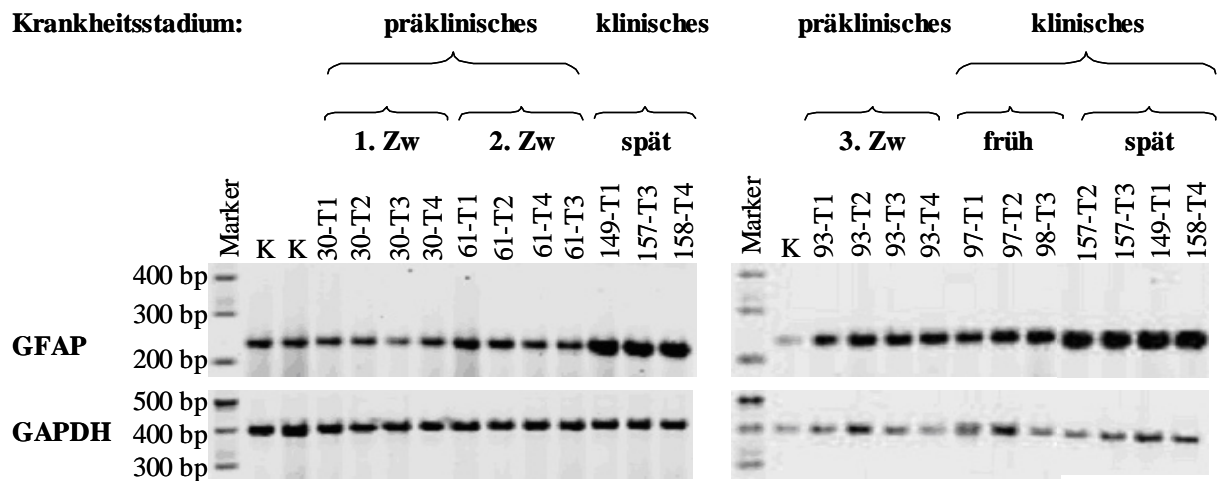


Abbildung 22: RT-PCR der RNA aus den Gehirnen von C57/Bl6-Mäusen nach ic-Inokulation. Zw = Zeitwert; K = Kontrollen; bp = Basenpaare; T = Tier.

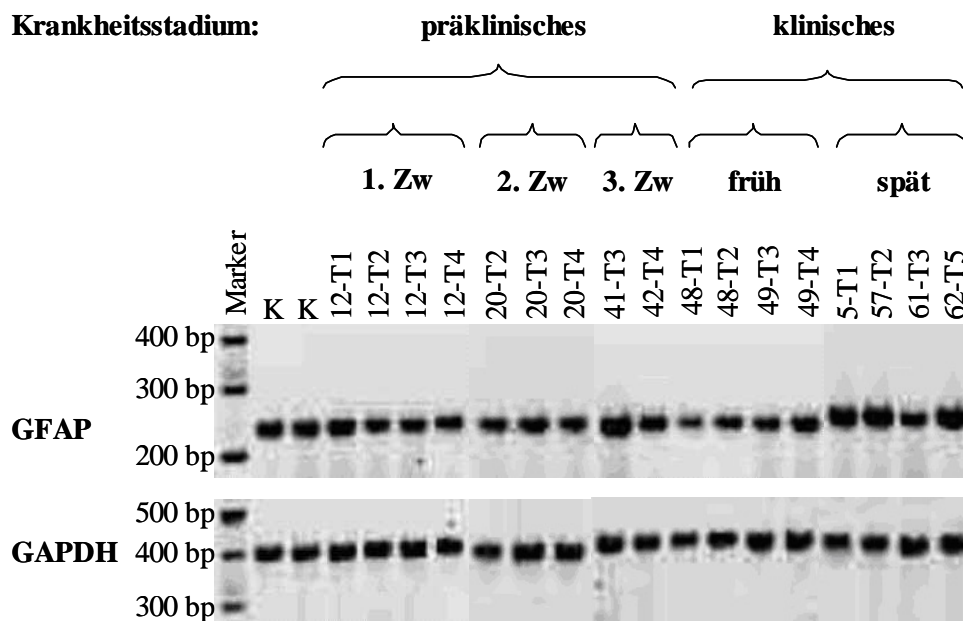


Abbildung 23: RT-PCR der RNA aus den Gehirnen von tga20-Mäusen nach ic-Inokulation. Zw = Zeitwert, K = Kontrollen; bp = Basenpaare; T = Tier.

4.3.1.3 Northern Blothybridisierung

Ausgewählte RNA-Proben wurden zusätzlich mittels Northern Blothybridisierung zur Bestätigung der vorangegangenen Ergebnisse getestet. Hierbei wurden, wie oben beschrieben, nach ic- und ip-Inokulation stellvertretend für die beiden Wildtyp-Mausstämme einzelne Tiere des CD-1-Stammes mit einzelnen Tieren des transgenen tga20-Stammes verglichen.

Auch in der Northern Blot Analyse zeigte sich, dass in den Gehirnen der CD-1-Mäuse bereits bei klinisch gesunden Tieren eine verstärkte GFAP-Transkription im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren stattfand, die im weiteren Verlauf der Erkrankung weiter anstieg (Abb. 24). Die zuvor nachgewiesene geringgradige Erhöhung der Astrozytenzahl sowie der GFAP-Transkription bei den CD-1-Tieren des zweiten präklinischen Zeitwertes konnten mittels Northern-Blothybridisierung nicht gezeigt werden (Abb. 24).

Die Ergebnisse des frühen und späten klinischen Stadiums wurden bestätigt. Alle untersuchten RNA-Proben dieser Zeitwerte zeigten einen starken Anstieg der GFAP-Transkription im Vergleich zu den Kontrolltieren an (Abb. 24).

Die Analyse ausgewählter RNAs aus den Gehirnen der tga20-Mäuse zeigte bei Tieren mit ersten klinischen Symptomen einer Scrapie-Erkrankung nur bei einem von zwei Mäusen eine geringgradige Erhöhung der GFAP-Genexpression im Vergleich zum Kontrolltier (Abb. 25).

Im späten klinischen Krankheitsstadium konnte, wie mit den vorangegangenen Nachweismethoden, in allen untersuchten Mäusen eine deutliche Induktion der GFAP-Genexpression beobachtet werden (Abb. 25), die jedoch schwächer ausgeprägt war als bei den Wildtyp-Mäusen (Abb. 35). Die in der immunhistochemischen Untersuchung auffällige tga20-Maus des präklinischen Stadiums (20 – Tier 2) zeigte weder mittels RT-PCR noch nach Northern Blothybridisierung eine hochregulierte GFAP-Genexpression im Gehirn. Auch hier zeigte sich, dass die drei Nachweismethoden bei deutlichen Veränderungen einheitliche Resultate liefern, dass jedoch im Falle einer geringgradig erhöhten Astrozytenzahl bzw. GFAP-Genexpression Abweichungen auftreten können.

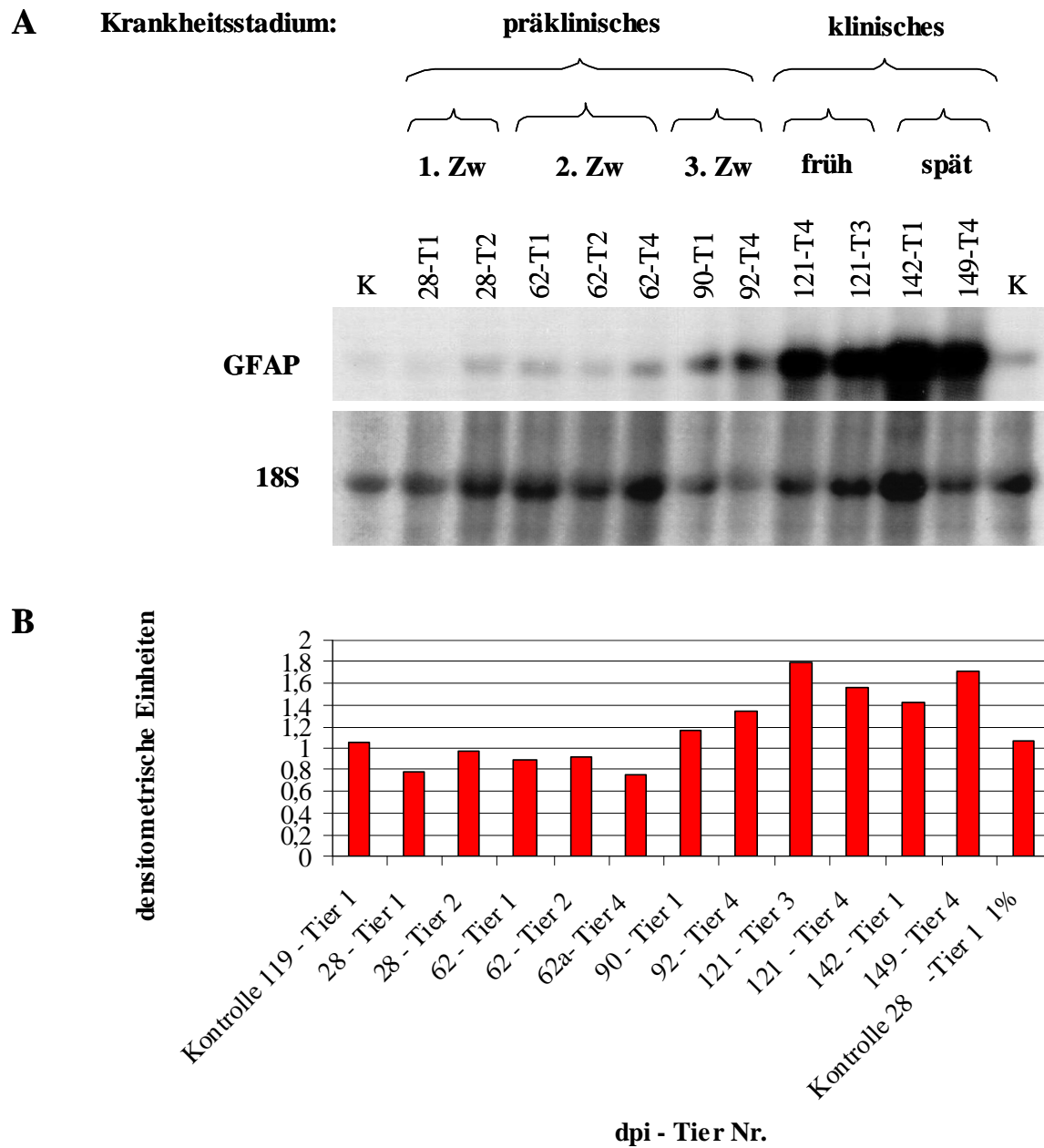


Abbildung 24: Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von CD-1-Mäusen nach ic-Inokulation. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. Zw = Zeitwert; K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

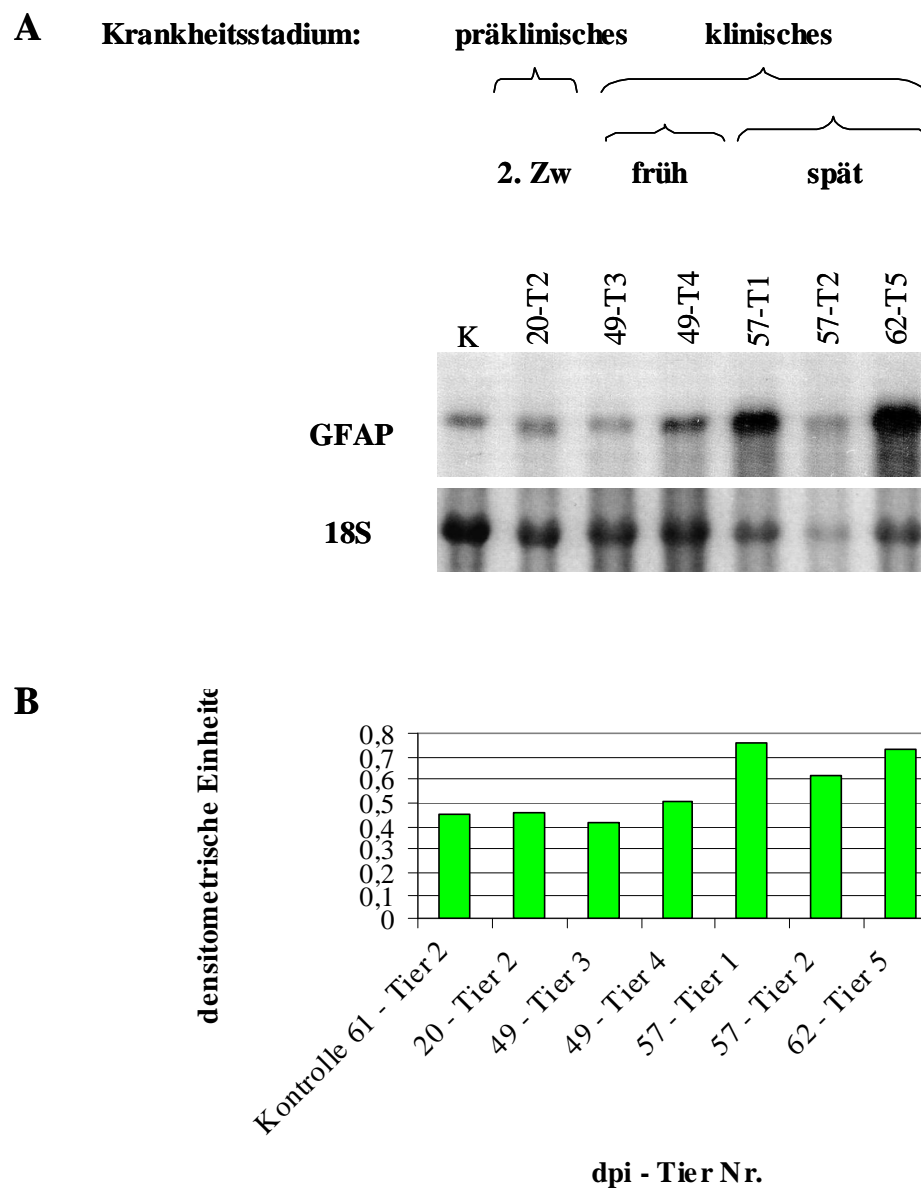


Abbildung 25: Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von tga20-Mäusen nach ic-Inokulation. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. Zw = Zeitwert; K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

4.3.2 Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation)

4.3.2.1 Immunhistochemie (IHC)

Zu den beiden frühesten Zeitwerten von klinisch unauffälligen Tieren wies eine der vier untersuchten CD-1-Mäuse (91 – Tier 2) und eine der vier tga20-Mäuse (41 – Tier 4) eine geringgradige Astrozyten-Aktivierung im Gehirn auf (1. Zw: Ergebnisse nicht gezeigt; 2. Zw: Tab. 15). Alle anderen untersuchten Tiere zeigten keine veränderten Astrozytenzahlen verglichen mit den gleichaltrigen Kontrolltieren.

Im weiteren Verlauf war, wie nach ic-Inokulation, in den Gehirnen aller klinisch unauffälligen Wildtyp-Mäuse eine deutliche Erhöhung der Astrozytenzahl zu beobachten, während nur zwei der vier ausgewerteten tga20-Mäuse eine geringgradige Aktivierung dieser Zellen aufwiesen (62 – Tier 2 und 3). Somit war für die Gruppe der tga20-Mäuse zu diesem Zeitwert keine wesentlich erhöhte Astrozytenzahl insgesamt erkennbar (Tab. 15, Abb. 26).

In den Gehirnen von tga20-Mäusen, die erste Anzeichen einer Scrapie-Erkrankung aufwiesen, konnte ebenfalls keine Astrozytose nachgewiesen werden (Tab. 15, Abb. 26). Im späten klinischen Krankheitsstadium zeigte sich nach der immunhistochemischen Markierung des GFAP nur bei einem der vier Tiere eine geringgradig erhöhte Astrozytenzahl, obwohl in allen Gehirnen dieser Tiere in der HE-Färbung vor allem im Bereich des Hirnstammes TSE-spezifische Vakuolen nachweisbar waren. Mit einem Mw 2 von 7,1 ergab sich somit kein wesentlicher Anstieg der Astrozyten in der Tiergruppe dieses Krankheitsstadiums insgesamt (Tab. 15, Abb. 26 und 27 C und F). Im Gegensatz dazu war bei allen Wildtyp-Mäusen, sowohl mit beginnenden Symptomen als auch im späten klinischen Krankheitsstadium, eine deutliche Zunahme der Astrozytenzahl und somit eine stark ausgebildete Astrozytose nachweisbar (Tab. 15, Abb. 26 und 27 A, B, D, E). Die Werte lagen mit einem Mw 2 von 20,4 bei den CD-1-Mäusen und 19,3 bei den C57/Bl6-Mäusen ähnlich hoch wie nach ic-Inokulation. Während also nach ic-Inokulation im späten klinischen Stadium von Scrapie in den Gehirnen aller drei Mausstämmen eine Astrozytose auftrat, zeigte sich nach ip-Inokulation nur in den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse eine deutliche Astrozyten-Aktivierung.

präklin. Stadium: 2. Zw			präklin. Stadium: 3. Zw			frühes klinisches Stadium		spätes klinisches Stadium		
dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte	dpi - Tier Nr.	Mittelwerte	
	Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2	Mw 1	Mw 2
Mausstamm: CD-1										
91 - Tier 1	6					168 - Tier 1	18	188 - Tier 1	n.a.	
" - Tier 2	11,5		168 - Tier 1	15,5		175 - Tier 2	22,3	" - Tier 2	17,8	
" - Tier 3	4,8		" - Tier 2	13,5		" - Tier 3	18,5	195 - Tier 3	22	
" - Tier 4	4,3	6,7	" - Tier 3	19	16	" - Tier 4	15	224 - Tier 4	21,3	20,4
								Kontrolle 190 - Tier 1	4	
								Kontrolle 190 - Tier 2	4,5	
Kontrolle 92 - Tier 1	6,5		Kontrolle 168 - Tier 1	6,8		Kontrolle 168 - Tier 1	6,8	Kontrolle 210 - Tier 1	4,8	
Kontrolle 92 - Tier 2	7	6,8	Kontrolle 168 - Tier 2	4	5,4	Kontrolle 168 - Tier 2	4	Kontrolle 210 - Tier 2	4	4,3
Mausstamm: C57/Bl6										
								195 - Tier 1	19	
92 - Tier 1	5,5		162 - Tier 1	11		162 - Tier 1	17	204 - Tier 2	19,8	
" - Tier 2	5,3		" - Tier 2	14,8		182 - Tier 2	19,5	" - Tier 3	18,8	
" - Tier 3	5,3		" - Tier 3	14,5		" - Tier 3	13,3	211 - Tier 4	21,5	
" - Tier 4	6	5,5	" - Tier 4	15,5	14	" - Tier 4	19,8	212 - Tier 5	16,8	19,3
Kontrolle 93 - Tier 1	6		Kontrolle 162 - Tier 1	5,5		Kontrolle 182 - Tier 1	4	Kontrolle 200 - Tier 1	4,3	
Kontrolle 93 - Tier 2	4,8	5,4	Kontrolle 162 - Tier 2	n.a.	5,5	Kontrolle 182 - Tier 2	4,5	Kontrolle 208 - Tier 2	4	4,2
Mausstamm: tga20										
41 - Tier 1	3,5		62 - Tier 1	4,8		76 - Tier 1	5,5	80 - Tier 1	6,3	
" - Tier 2	3,5		" - Tier 2	6,3		" - Tier 2	4,3	" - Tier 2	6,5	
" - Tier 3	3,5		" - Tier 3	9		77 - Tier 3	6,3	81 - Tier 3	6,3	
" - Tier 4	5,3	4	" - Tier 4	5,3	6,4	" - Tier 4	4,5	84 - Tier 4	9,3	7,1
			Kontrolle 61 - Tier 1	3,3						
Kontrolle 40 - Tier 1	3,8		Kontrolle 61 - Tier 2	3		Kontrolle 76 - Tier 1	6,3	Kontrolle 84 - Tier 1	5,5	
Kontrolle 40 - Tier 2	4	3,9	Kontrolle 62 - Tier 1	5,3	3,9	Kontrolle 76 - Tier 2	3,3	Kontrolle 84 - Tier 2	7	6,3

Tabelle 15: Auszählung der Astrozyten in den Gehirnen der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im präklinischen Stadium (2. und 3. Zw) sowie im frühen und späten klinischen Stadium nach ip-Inokulation. Mw1 = Mittelwert aus den vier Gehirnregionen pro Tier; Mw2 = Mittelwert aus den einzelnen Tieren (Mw1) pro Zeitwert. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar.

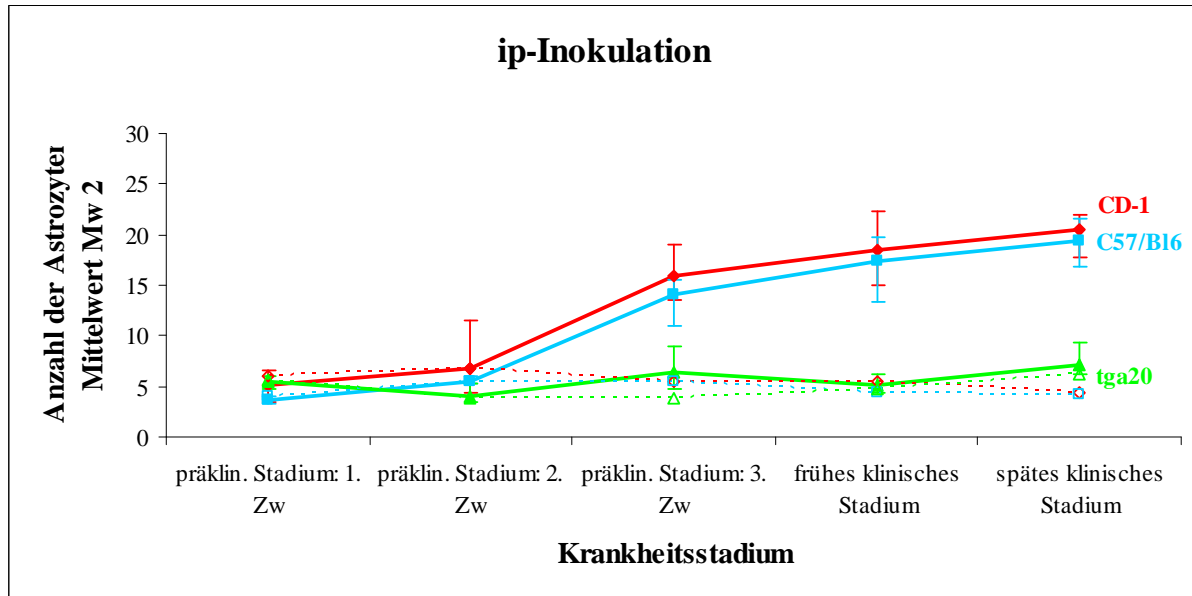


Abbildung 26: Mittelwerte Mw 2 der gezählten Astrozyten in den Gehirnen der verschiedenen Mausstämmen (CD-1, C57/B16 und tga20) nach ip-Inokulation. Durchgezogene Linien = inokulierte Tiere; gestrichelte Linien = Kontrolltiere; rot = CD-1-Mäuse; blau = C57/B16-Mäuse, grün = tga20-Mäuse. Zw = Zeitwert.

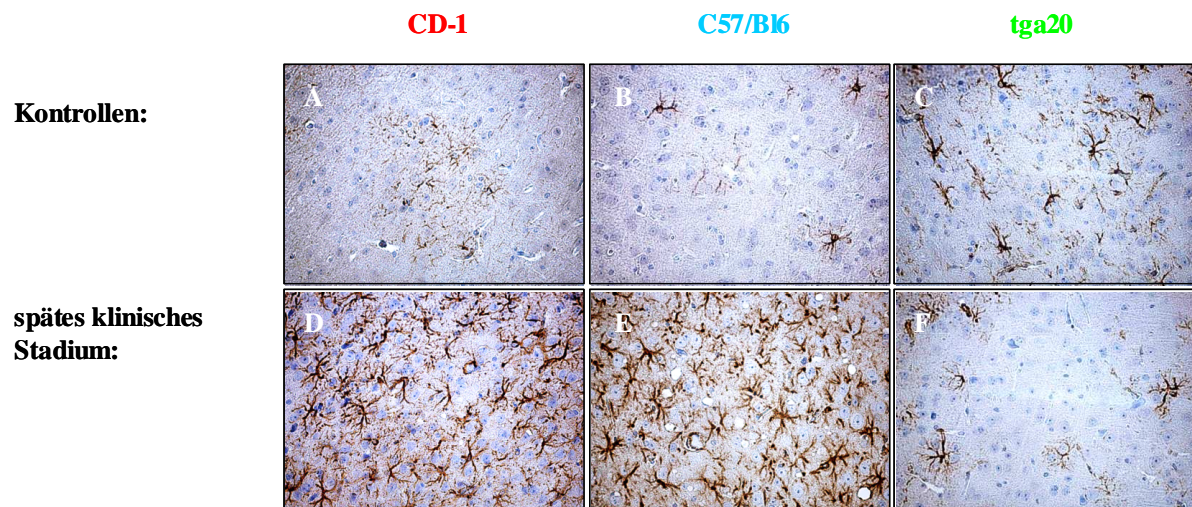


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis des GFAP im Bereich des Cortex nach ip-Inokulation (Vergrößerung: 40x). A–C = Kontrolltiere. D–F = terminal kranke Tiere (D: 224 dpi – Tier 4; E: 212 dpi – Tier 5; F: 84 dpi – Tier 4).

4.3.2.2 RT-PCR

Im präklinischen Stadium konnte zu den beiden frühesten Zeitwerten in keinem der Gehirne der drei Mäusstämme eine Zunahme der GFAP-Genexpression nachgewiesen werden (1. Zw: Ergebnisse nicht gezeigt; 2. Zw.: Tab. 16). Von Tier 2 der CD-1-Gruppe des 2. Zeitwertes, das in der immunhistochemischen Auswertung eine geringgradige Erhöhung der Astrozytenzahl aufwies, stand für die PCR und Northern Blot Analyse keine RNA zur Verfügung. Im weiteren Verlauf des präklinischen Stadiums konnten die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bestätigt werden. Alle untersuchten Gehirne der beiden Wildtyp-Mäusstämme wiesen eine GFAP/GAPDH Ratio deutlich über 1 auf (Mittelwert der CD-1-Mäuse: 1,34; Mittelwert der C57/Bl6-Mäuse: 1,24) (Tab. 16, Abb. 28 A), während in den Gehirnen der vier tga20-Mäuse nur Tier 3 eine geringgradig erhöhte Transkription von GFAP zeigte und sich somit keine erhöhte GFAP/GAPDH Ratio für diese Gruppe ergab (Tab. 16).

Auch in den anschließenden klinischen Krankheitsstadien konnte bei allen ausgewerteten Wildtyp-Mäusen eine deutliche Steigerung der GFAP-Genexpression beobachtet und somit die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bestätigt werden (Tab. 16, Abb. 28 A). Auch bezüglich der transgenen tga20-Mäuse zeigte sich eine ähnliche Tendenz wie zuvor in der immunhistochemischen Auswertung. In der Tiergruppe, die erste Symptome für eine Scrapie-Erkrankung aufwies, konnte kein Anstieg der GFAP-Transkription nachgewiesen werden (Tab. 16).

präklin. Stadium: 2. Zw				präklin. Stadium: 3. Zw				frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium			
dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw		dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw	
Mausstamm: CD-1															
91 - Tier 1	0,96							168 - Tier 1	1,5			188 - Tier 1	1,43		
" - Tier 2	keine RNA			168 - Tier 1	1,25			175 - Tier 2	1,29			" - Tier 2	1,22		
" - Tier 3	0,88			" - Tier 2	1,38			" - Tier 3	1,5			195 - Tier 3	1,38		
" - Tier 4	keine RNA	0,92		" - Tier 3	1,38	1,34		" - Tier 4	1,5	1,45		224 - Tier 4	1,44	1,37	
Mausstamm: C57/Bl6															
92 - Tier 1	1			162 - Tier 1	1,25			162 - Tier 1	1,33			195 - Tier 1	1,38		
" - Tier 2	keine RNA			" - Tier 2	1,13			182 - Tier 2	1,38			204 - Tier 2	1,33		
" - Tier 3	1			" - Tier 3	1,38			" - Tier 3	keine RNA			" - Tier 3	1,33		
" - Tier 4	1	1		" - Tier 4	1,2	1,24		" - Tier 4	1,2	1,3		211 - Tier 4	1,33		
Mausstamm: tga20															
41 - Tier 1	0,9			62 - Tier 1	1			76 - Tier 1	0,89			80 - Tier 1	0,9		
" - Tier 2	0,9			" - Tier 2	0,9			" - Tier 2	1			" - Tier 2	1,14		
" - Tier 3	keine RNA			" - Tier 3	1,1			77 - Tier 3	1,1			81 - Tier 3	1,25		
" - Tier 4	1	0,93		" - Tier 4	1	1		" - Tier 4	1,13	1,03		84 - Tier 4	1,22	1,13	

Tabelle 16: GFAP/GAPDH-Verhältnis nach RT-PCR Analyse der RNA aus den Gehirnen von ip-inokulierten Tieren der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im prä-klinischen Krankheitsstadium (1. und 2. Zw) sowie im frühen und späten klinischen Stadium von Scrapie. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Mw = Mittelwert; Nr. = Nummer.

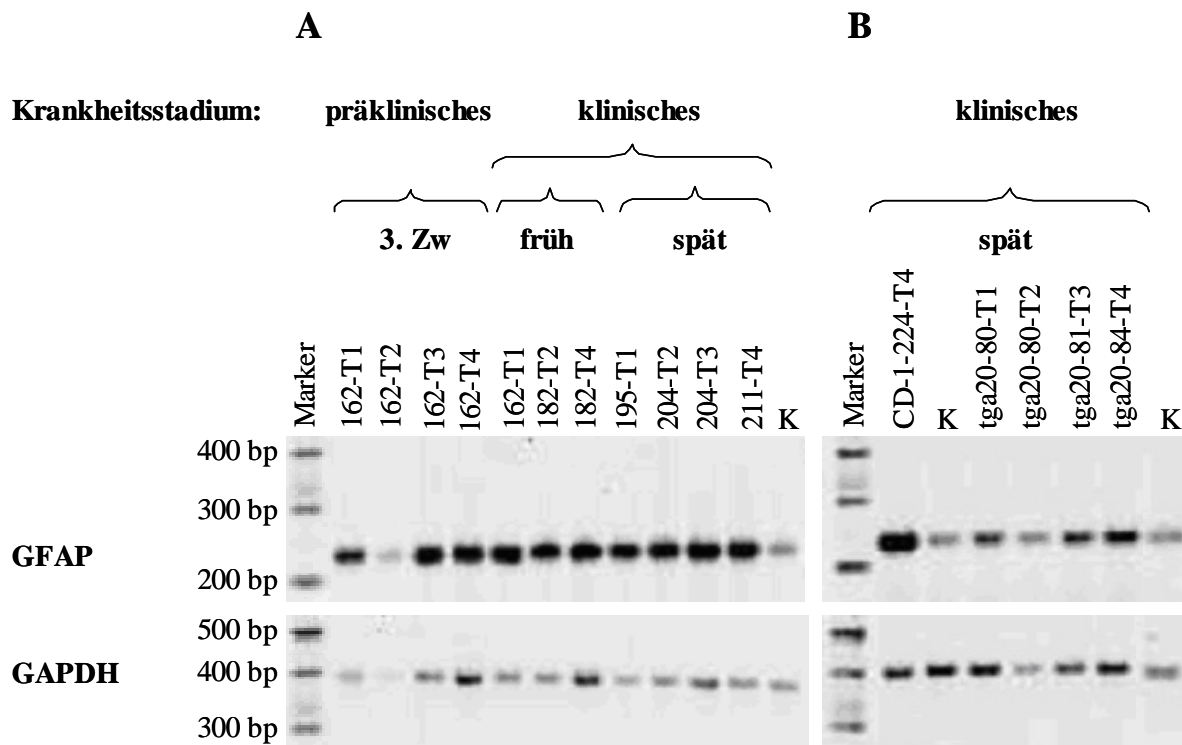


Abbildung 28: A: RT-PCR der RNA aus den Gehirnen von C57/Bl6-Mäusen nach ip-Inokulation. B: RT-PCR der RNA aus dem Gehirn einer repräsentativen CD-1-Maus im Vergleich zu den vier tga20-Mäusen im späten klinischen Krankheitsstadium nach ip-Inokulation. K = Kontrolle; Zw = Zeitwert; bp = Basenpaare; T = Tier.

Im Gegensatz zu der immunhistochemischen Markierung zeigte die PCR Analyse bei drei von vier tga20-Mäusen im späten klinischen Stadium von Scrapie eine Steigerung der Expression von GFAP (Tab. 16, Abb. 28 B). Diese Zunahme bei tga20-Mäusen (Mittelwert: 1,13) war jedoch erneut deutlich geringer im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Mausstämmen, bei denen die Berechnung des GFAP/GAPDH-Verhältnisses für CD-1-Mäuse einen Mittelwert von 1,37 und für C57/Bl6-Mäuse einen Mittelwert von 1,34 ergab (Tab. 16, Abb. 28 B).

4.3.2.3 Northern Blot hybridisierung

Auch nach ip-Inokulation wurden ausgewählte RNAs mittels Northern Blot hybridisierung getestet. Die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR Analyse für die CD-1-Mäuse konnten für alle Krankheitsstadien überwiegend bestätigt werden (Abb. 29). Lediglich ein Tier aus dem frühen klinischen Stadium von Scrapie (175 – Tier 2) wies keinen Anstieg der GFAP-Genexpression in der Northern Blot Analyse auf (Abb. 29).

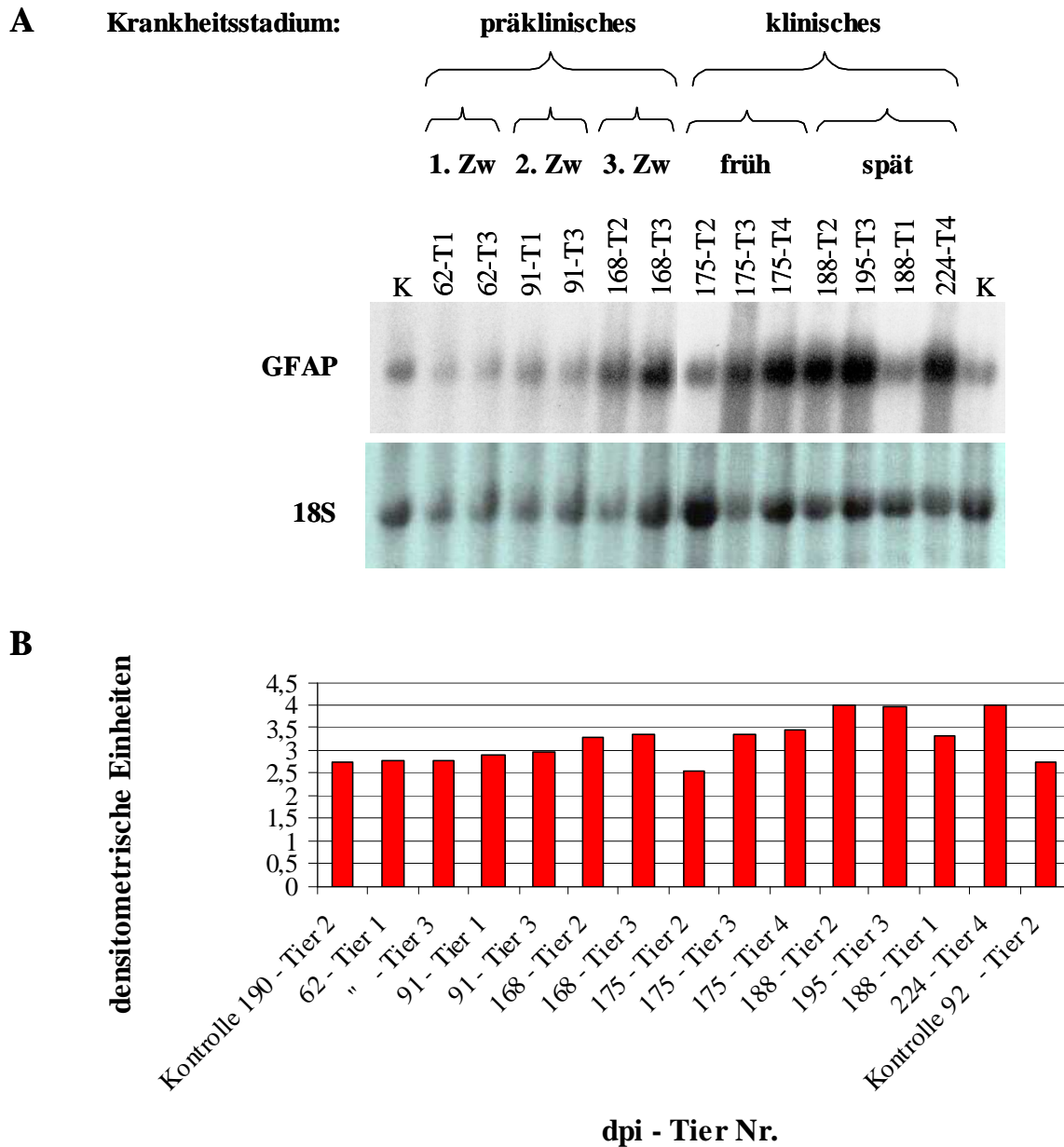


Abbildung 29: Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von CD-1-Mäusen nach ip-Inokulation. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. Zw = Zeitwert; K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

Bei dem transgenen Mausstamm konnte auch mittels Northern Blot Analyse gezeigt werden, dass bei klinisch kranken Tieren nach intraperitonealer Inokulation keine bzw. eine schwächere Induktion der GFAP-Genexpression als bei den Wildtyp-Mäusen im Gehirn stattfand (Abb. 30 und 35). Im späten klinischen Stadium wies nur eines der vier Tiere eine leichte Erhöhung der GFAP-Transkription auf (Abb. 30). Es handelte sich hierbei um dasselbe Tier, das auch in der IHC als einziges Tier dieser Gruppe eine geringgradige Astrozytose zeigte (84c – Tier 4). Demnach ergab sich für die tga20-Mäuse durchschnittlich eine Erhöhung der GFAP-

Genexpression um 0,01 im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren, während die Differenz bei CD-1-Mäusen bei 0,79 lag. Dieser evidente Unterschied ist auch in Abbildung 35 dargestellt.

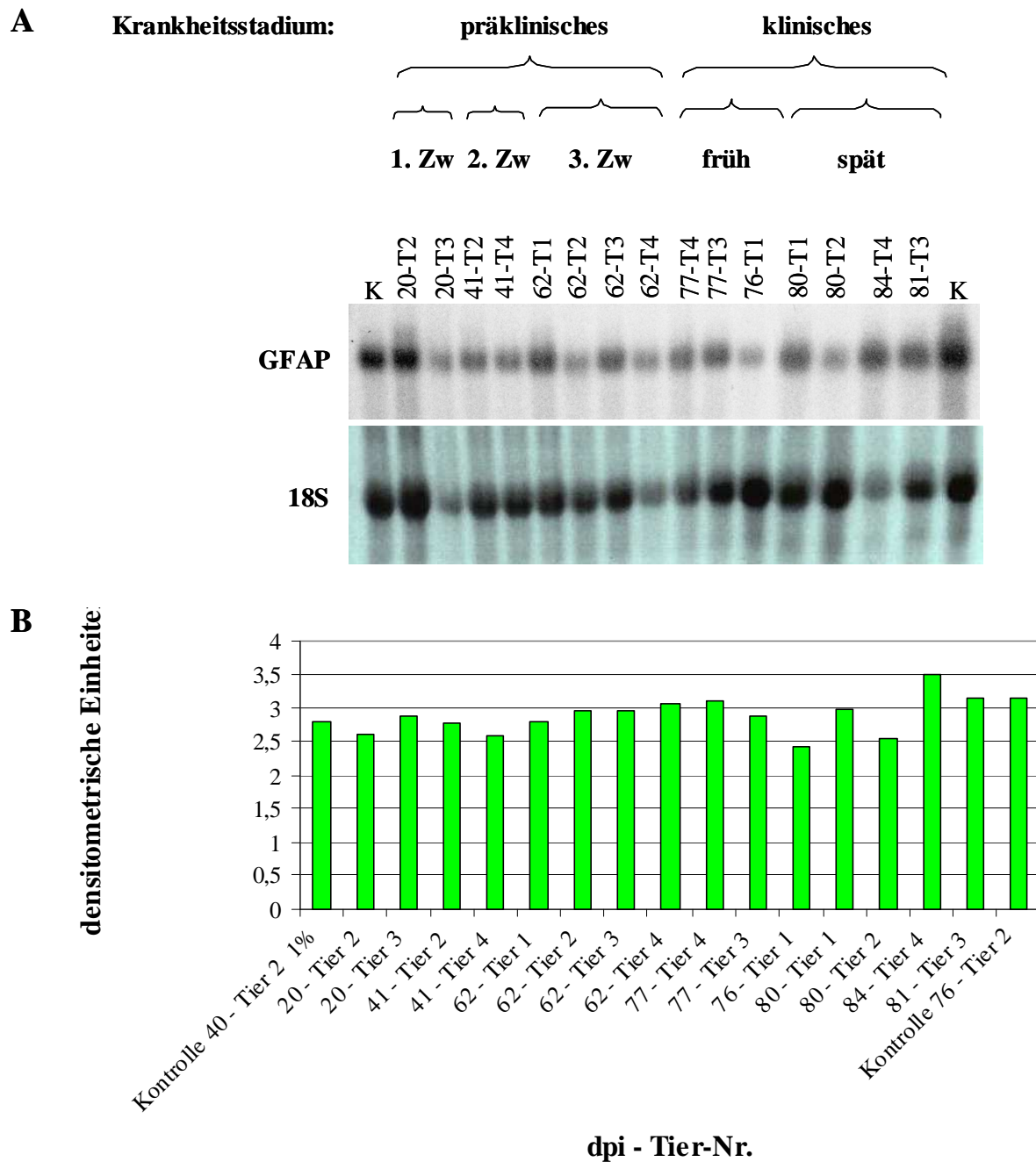


Abbildung 30: Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von tga20-Mäusen nach ip-Inokulation. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. Zw = Zeitwert; K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

4.3.3 Orale Inokulation

4.3.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Nach oraler Inokulation zeigten einzelne, überwiegend ältere, klinisch gesunde Tiere aller drei Mausstämme eine geringgradige Erhöhung der Astrozytenzahl im Gehirn. Vereinzelt trat dies jedoch auch bei Kontrolltieren auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich auf das hohe Alter der Tiere zurückzuführen. Es ist bekannt, dass mit fortschreitendem Alter die Zahl der Astrozyten zunimmt (Hayakawa *et al.* 2007, Mouton *et al.* 2002) und es insgesamt zu einer altersbedingten Induktion von Stress-korrelierten Genen im Gehirn kommt (Yankner *et al.* 2008).

Bei einer klinisch gesunden C57/Bl6-Maus konnte nach 212 dpi jedoch mit einem Mittelwert 1 von 16,5 im Vergleich zu einem Mittelwert 2 von 4,2 der beiden Kontrolltiere eine deutliche Astrozytose im Gehirn nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um dasselbe Tier, das zuvor bereits eine deutliche Vakuolisierung des Gehirns zeigte (siehe Kapitel 4.4.3.1, Abb. 48).

In den klinischen Stadien zeigten sich bei den beiden Wildtyp-Mausstämmen ähnliche Ergebnisse wie nach den vorangegangenen Inokulationswegen und es ergaben sich auch hier keine Unterschiede zwischen Tieren, die mit 1%igem und solchen, die mit 10%igem Gehirnhomogenat oral inokuliert worden waren (Tab. 17, Abb. 31 und 32). In den Gehirnen aller klinisch kranken Tiere war eine signifikante Erhöhung der Zellzahl und somit eine Astrozytose nachweisbar. Nach oraler Inokulation lagen die Astrozytenzahlen in den Gehirnen von C57/Bl6-Mäusen des späten klinischen Stadiums (Mittelwert 2: 20,5) jedoch höher als in denen von CD-1-Mäusen im vergleichbaren Krankheitsstadium (Mittelwert 2: 16,1) (Tab. 17, Abb. 31).

Bei klinisch kranken tga20-Mäusen konnte, im Gegensatz zur ip-Inokulation, ebenfalls eine deutliche Astrozyten-Aktivierung nachgewiesen werden (Tab. 17, Abb. 31 und 32), die aber, wie auch nach ic-Inokulation, geringer war verglichen mit den beiden Wildtyp-Mausstämmen.

frühes klinisches Stadium			spätes klinisches Stadium		
dpi - Tier Nr.	Mittelwerte		dpi - Tier Nr.	Mittelwerte	
	Mw 1	Mw 2		Mw 1	Mw 2
Mausstamm: CD-1					
210 - Tier 1 (1%)	21,3				
" - Tier 2 "	18,3				
" - Tier 3 "	15,3		237 - Tier 1 (1%)	12,5	
" - Tier 4 "	19,3		257 - Tier 1 "	17,3	
175 - Tier 1 (10%)	14,5		210 - Tier 1 (10%)	15,5	
188 - Tier 2 "	18,5		220 - Tier 2 "	18	
200 - Tier 3 "	17		235 - Tier 3 "	16,5	
215 - Tier 4 "	13,3	17,2	260 - Tier 4 "	16,5	16,1
Kontrolle 190 - Tier 1	4				
Kontrolle 190 - Tier 2	4,5		Kontrolle 210 - Tier 1	4,8	
Kontrolle 210 - Tier 1	4,8		Kontrolle 210 - Tier 2	4	
Kontrolle 210 - Tier 2	4	4,3	Kontrolle 237 - Tier 1	n.a.	4,4
Mausstamm: C57/Bl6					
			226 - Tier 1 (1%)	21,3	
			252 - Tier 1 "	21,8	
262 - Tier 1 (1%)	16	16	268 - Tier 1 "	18,5	20,5
			Kontrolle 226 - Tier 1	4,5	
Kontrolle 262 - Tier 2	5		Kontrolle 262 - Tier 2	5	
Kontrolle 262 - Tier 2	5	5	Kontrolle 262 - Tier 2	5	4,8
Mausstamm: tga20					
142 - Tier 1 (1%)	9		139 - Tier 1 (1%)	7,5	
153 - Tier 2 "	9,3		145 - Tier 2 "	8	
75 - Tier 1 (10%)	8		95 - Tier 1 (10%)	10	
140 - Tier 2 "	8,8		109 - Tier 2 "	9,8	
145 - Tier 3 "	7,8	8,6	137 - Tier 3 "	10,5	9,2
Kontrolle 76 - Tier 1	6,3				
Kontrolle 76 - Tier 2	3,3		Kontrolle 90 - Tier 1	5,5	
Kontrolle 142 - Tier 1	6,8		Kontrolle 90 - Tier 2	4,8	
Kontrolle 153 - Tier2	5,5	5,5	Kontrolle 142 - Tier 1	6,8	5,7

Tabelle 17: Auszählung der Astrozyten in den Gehirnen der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium nach oraler Inokulation. Mw1 = Mittelwert aus den vier Gehirnregionen pro Tier; Mw2 = Mittelwert aus den einzelnen Tieren (Mw1) pro Zeitwert. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar.

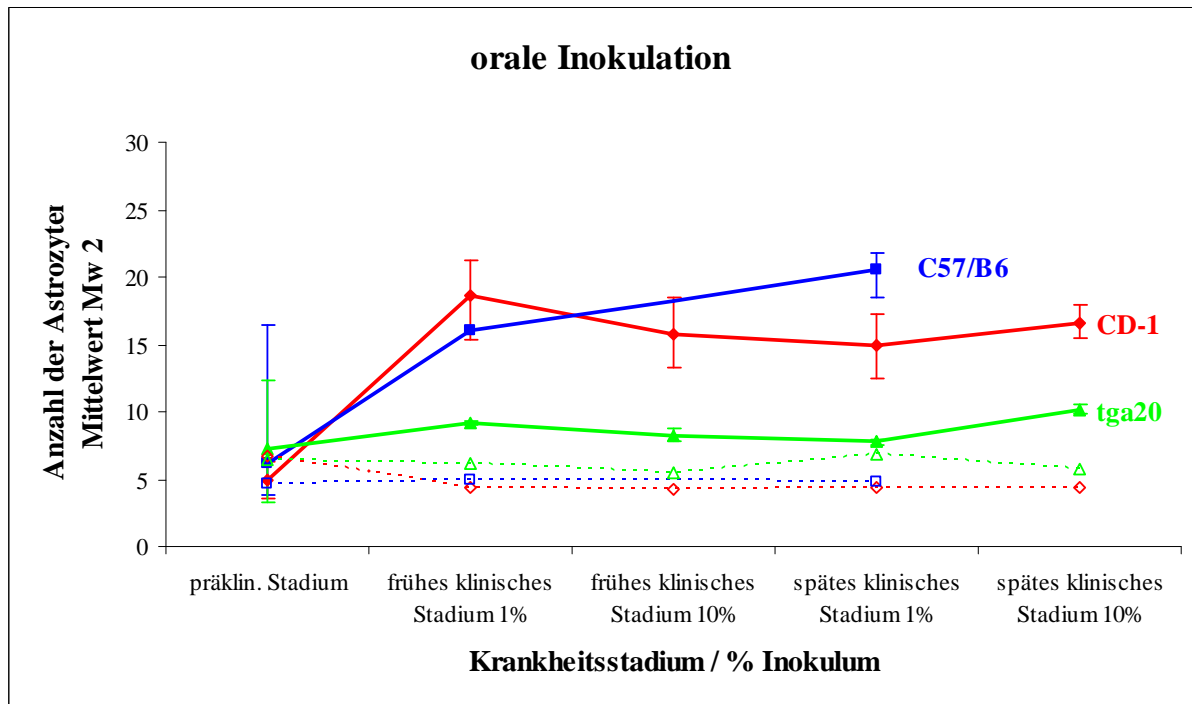


Abbildung 31: Mittelwerte Mw 2 der gezählten Astrozyten in den Gehirnen der verschiedenen Mausstämme (CD-1, C57/B16 und tga20) nach oraler Inokulation. Durchgezogene Linien = inokulierte Tiere; gestrichelte Linien = Kontrolltiere; rot = CD-1-Mäuse; blau = C57/B16-Mäuse, grün = tga20-Mäuse. Zw = Zeitwert.

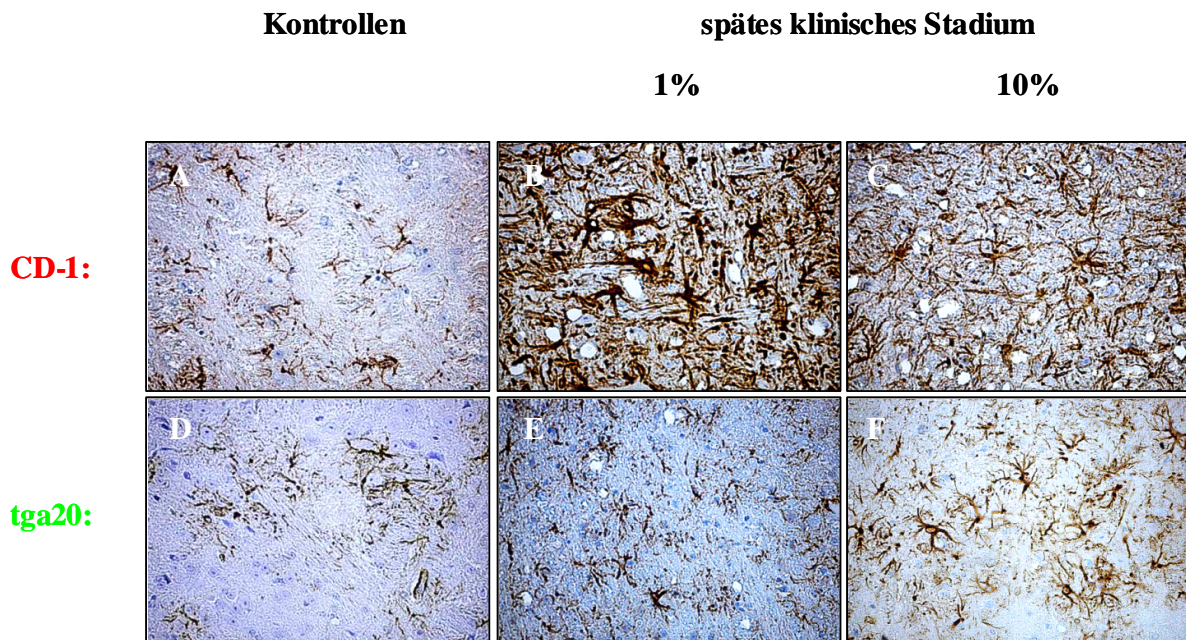


Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis des GFAP in den Gehirnen von CD-1 (A-C) und tga20-Mäusen (D-F) nach oraler Inokulation mit 1%igem bzw. 10%igem Gehirnhomogenat (Hirnstamm, Vergrößerung: 40x). B: 257 dpi – Tier 1; C: 220 dpi – Tier 2; E: 145 dpi – Tier 2; F: 109 dpi – Tier 2.

4.3.3.2 RT-PCR

In den Gehirnen klinisch unauffälliger Tiere zeigten, wie zuvor nach immunhistochemischer Auswertung, einzelne Tiere eine sehr geringgradige Induktion der GFAP-Genexpression (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch hier wurden die Befunde der immunhistochemischen Auswertung nach PCR Analyse nicht in allen Fällen bestätigt. Im Gehirn der klinisch gesunden C57/Bl6-Maus (212 – Tier 2), die eine deutlich erhöhte Astrozytenzahl sowie TSE-spezifische Vakuolen aufwies, wurde auch in der PCR Analyse eine starke Induktion der GFAP-Genexpression nachgewiesen (GFAP/GAPDH-Verhältnis: 1,4). Es zeigte sich erneut, dass die verschiedenen Nachweismethoden in den Fällen geringgradiger Veränderungen abweichende Ergebnisse lieferten, dass sich aber bei ausgeprägten Astrozytosen einheitliche Resultate ergaben.

Im frühen sowie im späten klinischen Krankheitsstadium wiesen alle untersuchten Gehirne der drei Mausstämme eine erhöhte GFAP-Transkription auf (Tab. 18, Abb. 33). Die Gehirne der tga20-Mäuse zeigten, wie auch nach immunhistochemischer Untersuchung, eine geringere Induktion der GFAP-Genexpression als die Gehirne beider Wildtyp-Mausstämme (Tab. 18, Abb. 33). Während die berechneten Mittelwerte der tga20-Mäuse bei 1,19 (frühes klinisches Stadium) und 1,26 (spätes klinisches Stadium) lagen, ergaben sich für Wildtyp-Mäuse Werte von 1,4 bzw. 1,44 (frühes klinisches Stadium) und 1,52 bzw. 1,39 (spätes klinisches Stadium) (Tab. 18). Die Verstärkung der GFAP-Transkription in allen untersuchten Proben korrelierte demnach mit der mittels IHC gezeigten Erhöhung der Astrozytenzahl.

frühes klinisches Stadium			spätes klinisches Stadium		
dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw	dpi - Tier Nr.	Verhältnis	Mw
Mausstamm: CD-1					
210 - Tier 1 (1%)	1,44				
" - Tier 2 "	1,3				
" - Tier 3 "	1,4		237 - Tier 1 (1%)	1,56	
" - Tier 4 "	1,44		257 - Tier 1 "	1,3	
175 - Tier 1 (10%)	1,38		210 - Tier 1 (10%)	1,33	
188 - Tier 2 "	1,33		220 - Tier 2 "	1,71	
200 - Tier 3 "	1,38		235 - Tier 3 "	1,38	
215 - Tier 4 "	1,57	1,4	260 - Tier 4 "	1,83	1,52
Mausstamm: C57/Bl6					
			226 - Tier 1 (1%)	1,44	
			252 - Tier 1 "	1,44	
262 - Tier 1 (1%)	1,44	1,44	268 - Tier 1 "	1,3	1,39
Mausstamm: tga20					
142 - Tier 1 (1%)	1,1		139 - Tier 1 (1%)	1,2	
153 - Tier 2 "	1,1		145 - Tier 2 "	1,22	
75 - Tier 1 (10%)	1,25		95 - Tier 1 (10%)	1,43	
140 - Tier 2 "	1,13		109 - Tier 2 "	1,25	
145 - Tier 3 "	1,38	1,19	137 - Tier 3 "	1,22	1,26

Tabelle 18: GFAP/GAPDH-Verhältnis nach PCR Analyse der RNA aus den Gehirnen von oral inokulierten Tieren der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Mw = Mittelwert; Nr. = Nummer.

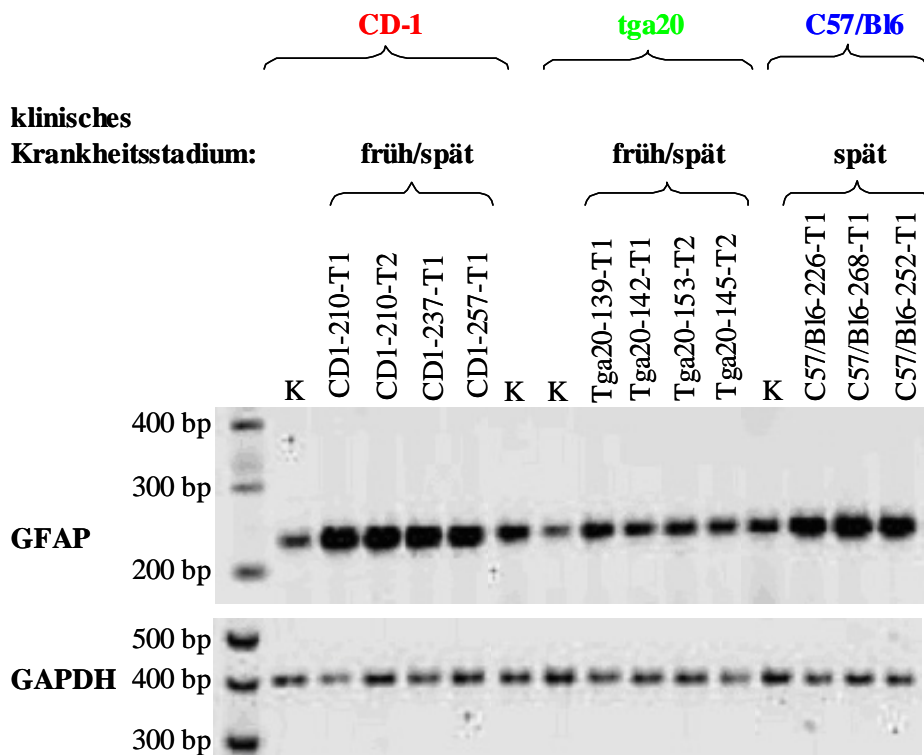


Abbildung 33: RT-PCR der RNA aus den Gehirnen der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach oraler Inokulation. K = Kontrollen; bp = Basenpaare; T = Tier.

4.3.3.3 Northern-Blothybridisierung

Ausgewählte RNAs des frühen und späten klinischen Stadiums wurden zusätzlich zu der immunhistochemischen Auswertung und PCR Analyse mittels Northern Blothybridisierung ausgewertet (Abb. 34). Die Ergebnisse korrelierten mit den vorangegangenen Ergebnissen der PCR. Sowohl alle untersuchten Wildtyp-Mäuse als auch alle untersuchten tga20-Mäuse zeigten eine erhöhte GFAP-Genexpression im Gehirn, die bei den Wildtyp-Mäusen jedoch stärker ausgeprägt war als bei den Tieren des transgenen Mausstammes (Abb. 34 und 35). Während bei den klinisch kranken tga20-Mäusen durchschnittlich eine Verstärkung der GFAP-Transkription um 0,56 im Vergleich zu Kontrolltieren auftrat, zeigte sich bei den klinisch kranken CD-1-Mäusen eine Differenz von 1,21.

Für das präklinische Stadium wurde nur die C57/Bl6-Maus (212 – Tier 2), die bereits eine gering- bzw. gering- bis mittelgradige Vakuolisierung in allen untersuchten Gehirnregionen sowie eine Astrozytose nach immunhistochemischer Auswertung und PCR Analyse aufwies, auch mittels Northern Blothybridisierung analysiert. Mit einem GFAP/18s rRNA-Verhältnis von 3,21 verglichen mit einem Wert von 2,7 des Kontrolltieres zeigte sich auch nach Northern Blot Analyse eine Verstärkung der GFAP-Transkription bei diesem Tier (Ergebnis nicht gezeigt).

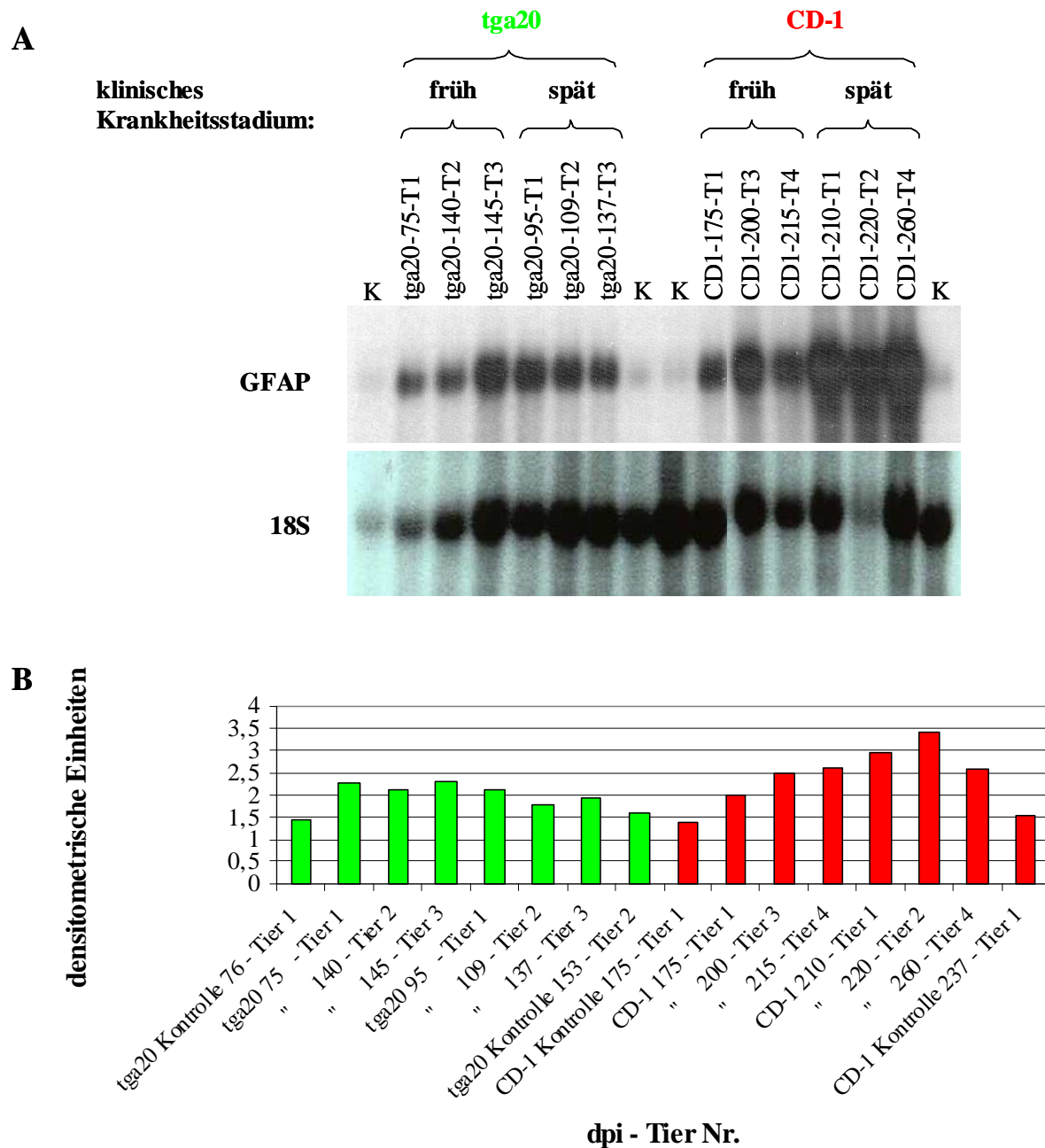


Abbildung 34: Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von CD-1- und tga20-Mäusen nach oraler Inokulation im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

4.3.4 Zusammenfassung

Auch bei der Beurteilung des GFAP zeigten sich die deutlichsten Unterschiede bei dem Vergleich der beiden Wildtyp-Mausstämme mit dem transgenen Mausstamm. Auffallend war wiederum die evident schwächere Ausbildung einer Astrozytose in den Gehirnen der tga20-Mäuse verglichen mit den Gehirnen von CD-1 und C57/Bl6-Mäusen bei vergleichbarer Ausprägung TSE-spezifischer Symptome. Außerdem trat eine präklinische Astrozytenaktivierung regelmäßig und markant nur bei den Wildtyp-Mäusen auf.

Beide Wildtyp-Mausstämme zeigten vergleichbare Ergebnisse nach den drei Inokulationswegen. In allen drei Nachweismethoden wiesen die Gehirne der Wildtyp-Mäuse stark erhöhte Astrozytenzahlen bzw. eine deutliche Verstärkung der GFAP-Genexpression bei allen klinisch kranken Mäusen und ab dem dritten präklinischen Zeitwert auch bei klinisch unauffälligen Tieren auf. Zu sehr frühen Zeitpunkten zeigten sich teilweise geringgradig erhöhte GFAP-Werte, die nicht von TSE-spezifischen Vakuolen begleitet waren und umgekehrt. Im weiteren Verlauf jedoch ab dem dritten präklinischen Zeitwert bis hin zum späten klinischen Krankheitsstadium ging die Astrozytose immer auch mit einer ausgeprägten Vakuolisierung der Gehirne einher. Mittels HE-Färbung zeigte sich, dass die Gehirne der C57/Bl6-Mäuse nach allen drei Inokulationswegen etwas schwächer vakuolisiert waren als die der CD-1-Mäuse. Dies korrelierte nicht immer auch mit einer schwächeren Ausbildung der Astrozytose. Nach den beiden peripheren Inokulationswegen war die Astrozytenaktivierung in den C57/Bl6-Gehirnen ähnlich bzw. stärker als in den Proben der CD-1-Mäuse.

Die Untersuchung der Gehirne der tga20-Mäuse ergab Unterschiede zwischen ic-, ip- und oraler Inokulation. Nach intrazerebraler Inokulation wurde mit allen drei Nachweismethoden nur für die Tiergruppe des späten klinischen Stadiums eine Astrozytose festgestellt, die ihrerseits schwächer ausgebildet war als in den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen. Nach ip-Inokulation konnte nur mittels RT-PCR Analyse eine erhöhte GFAP-Transkription in der vergleichbaren Tiergruppe nachgewiesen werden, die ebenfalls geringer war als bei beiden Wildtyp-Mausstämmen und als bei ic- bzw. oral inokulierten tga20-Mäusen. Oral inokulierte tga20-Mäuse zeigten mit allen drei Methoden eine verstärkte GFAP-Transkription in den Gruppen der klinischen Krankheitsstadien, die ebenfalls, wie auch nach den vorangegangenen Inokulationswegen, auffallend schwächer ausgebildet war als in Wildtyp-Gehirn. Eine Korrelation zwischen Astrozytose und Vakuolisierung wie sie bei den Wildtyp-Mäusen ab dem dritten präklinischen Zeitwert auftrat, zeigte sich bei den tga20-Mäusen erst bei klinisch kranken Tieren und nur nach ic- und oraler Inokulation.

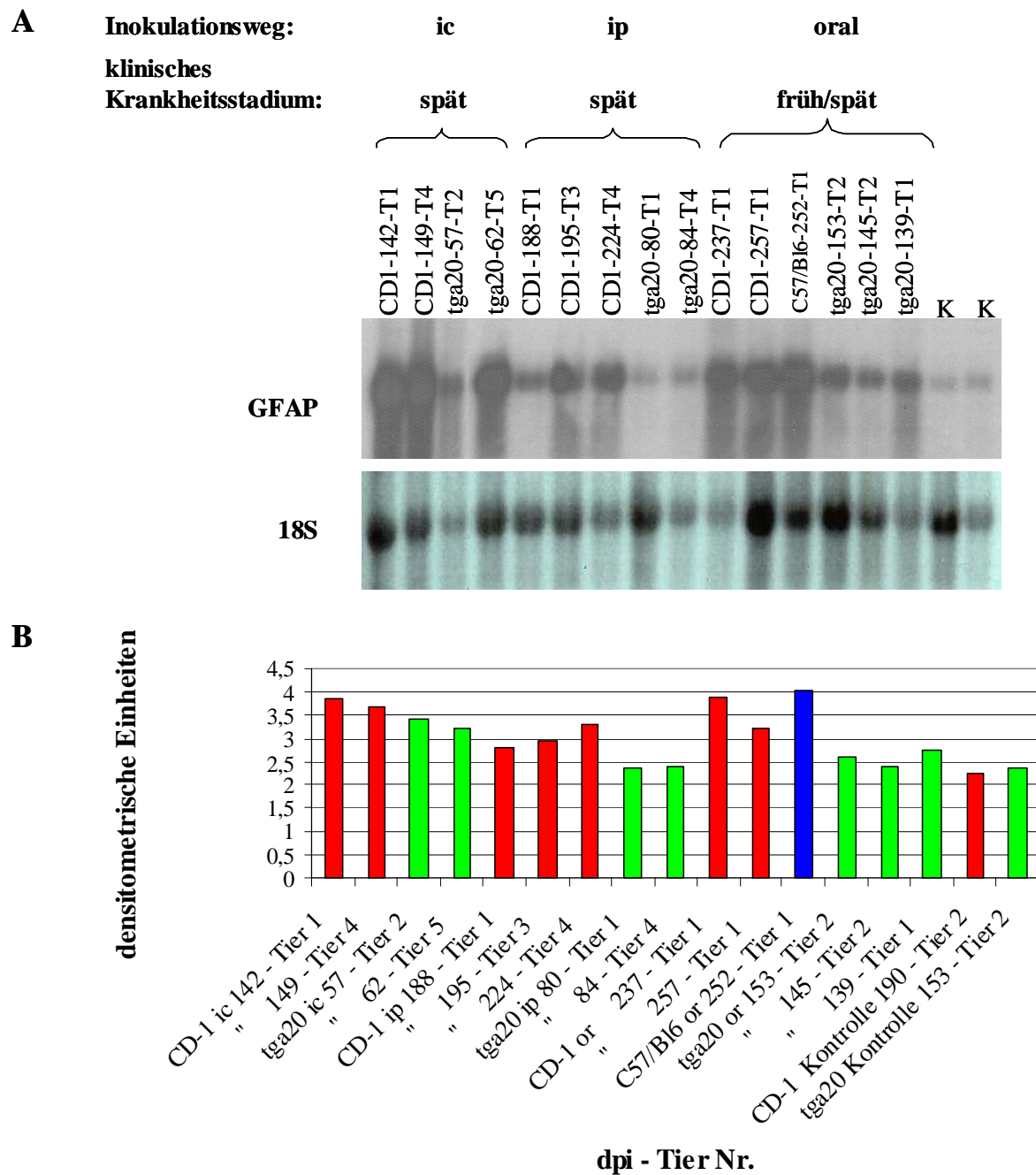


Abbildung 35: : Northern Blot Analyse der RNA aus den Gehirnen von Wildtyp- und tga20-Mäusen nach den drei Inokulationswegen im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. A: Northern Blothybridisierung. B: Densitometrie. K = Kontrollen; T = Tier; dpi = Tage nach Inokulation.

Es zeigte sich also mit allen drei Untersuchungsmethoden und in allen Fällen die Tendenz, dass in vergleichbaren klinischen Krankheitsstadien sowohl nach intrazerebraler als auch nach intraperitonealer und oraler Inokulation die Ausbildung einer Astrozytose bzw. der Anstieg der GFAP-Transkription in den Gehirnen der transgenen tga20-Mäuse geringer war als in den Gehirnen der CD-1- bzw. C57/Bl6-Wildtyp-Mäuse (Abb. 35). Präklinisch waren nur bei den beiden Wildtyp-Mausstämmen signifikant erhöhte Astrozytenzahlen bzw. eine verstärkte GFAP-Transkription in allen Tieren einer Gruppe nachweisbar.

Es zeigte sich außerdem, dass die immunhistochemische Untersuchung und die Analysen der Genexpression in den Fällen einer deutlichen Erhöhung der GFAP-Transkription einheitliche Ergebnisse lieferten, während sich bei geringgradigen Veränderungen abweichende Resultate mit den verschiedenen Methoden ergaben.

4.4 Nachweis von PrPsc

Nachdem bei der Beurteilung der Vakuolisierung und der Ausbildung einer Astrozytose deutliche Unterschiede vor allem zwischen den Wildtyp- und den transgenen Mäusen festgestellt wurden, sollte nun untersucht werden, ob sich diese Ergebnisse auch in einer unterschiedlichen Stärke bzw. Art der Ablagerung von pathologischem Prion-Protein (PrPsc) widerspiegeln.

Dazu wurde PrPsc zunächst mittels immunhistochemischer Methode angefärbt. Die Auswertung erfolgte am Sagittalschnitt der Gehirnhälften, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Nach Anfertigung von histologischen Schnitten erfolgte die Markierung von PrPsc mit dem monoklonalen Primärantikörper SAF84. Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettich Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) Konjugat verwendet. Zusätzlich wurde die Markierung mit dem Tyramide Signal Amplification (TSA) Biotin System verstärkt und schließlich mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Die PrPsc-spezifische Markierung stellte sich als dunkelbraune, feingranuläre Ablagerungen dar. In den Gehirnen von Kontrolltieren der Wildtyp-Mausstämme trat teilweise eine geringgradige unspezifische Hintergrundfärbung auf, die sich hellbraun und schlierig darstellte und daher gut von der spezifischen PrPsc-Markierung abzugrenzen war. In den Gehirnen der transgenen tga20-Mäuse zeigte sich eine Hintergrundfärbung, die im Gegensatz zu der in den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse teilweise wesentlich stärker war. Auch hier war die Hintergrundfärbung gleichmäßig schlierig, so dass sich die dunkelbraunen, granulären PrPsc-spezifischen Ablagerungen deutlich vom unspezifischen Hintergrund abhoben (Abb. 36 I). Im Bereich des Stratum granulare und des Stratum moleculare des Kleinhirns war eine Abgrenzung zwischen unspezifischer Hintergrundfärbung und spezifischen PrPsc-Ablagerungen allerdings nicht möglich (Abb. 36 G). Diese Anteile des Kleinhirns wurden daher in den Gehirnen der tga20-Mäuse nicht beurteilt. Die starke Hintergrundfärbung in tga20-Gehirnen ist vermutlich auf die Überexpression des zellulären Prion-Proteins (PrPc) bei diesem Mausstamm zurückzuführen. PrPc wird in Gehirnen der tga20-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mausstämmen um das Zehnfache überexprimiert (Fischer *et al.* 1996). Die bisher erhältlichen Antikörper gegen das Prion-Protein sind nicht spezifisch gegen die pathologische Form gerichtet. Sie erkennen auch

immer die zelluläre Form. Durch die aufwendigen Vorbehandlungen beim immunhistochemischen Nachweis kann die Bindung des Antikörpers an die zelluläre Form zwar abgeschwächt, aber nicht vollständig verhindert werden (Diedrich *et al.* 1991). In den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse zeigte sich, dass die Vorbehandlungen des hier angewendeten Protokolls durchaus wirksam sind. Es trat nur teilweise eine sehr geringe Hintergrundfärbung auf, die sich gut von der spezifischen PrPsc-Markierung abgrenzen ließ (Abb. 36 A bis F).

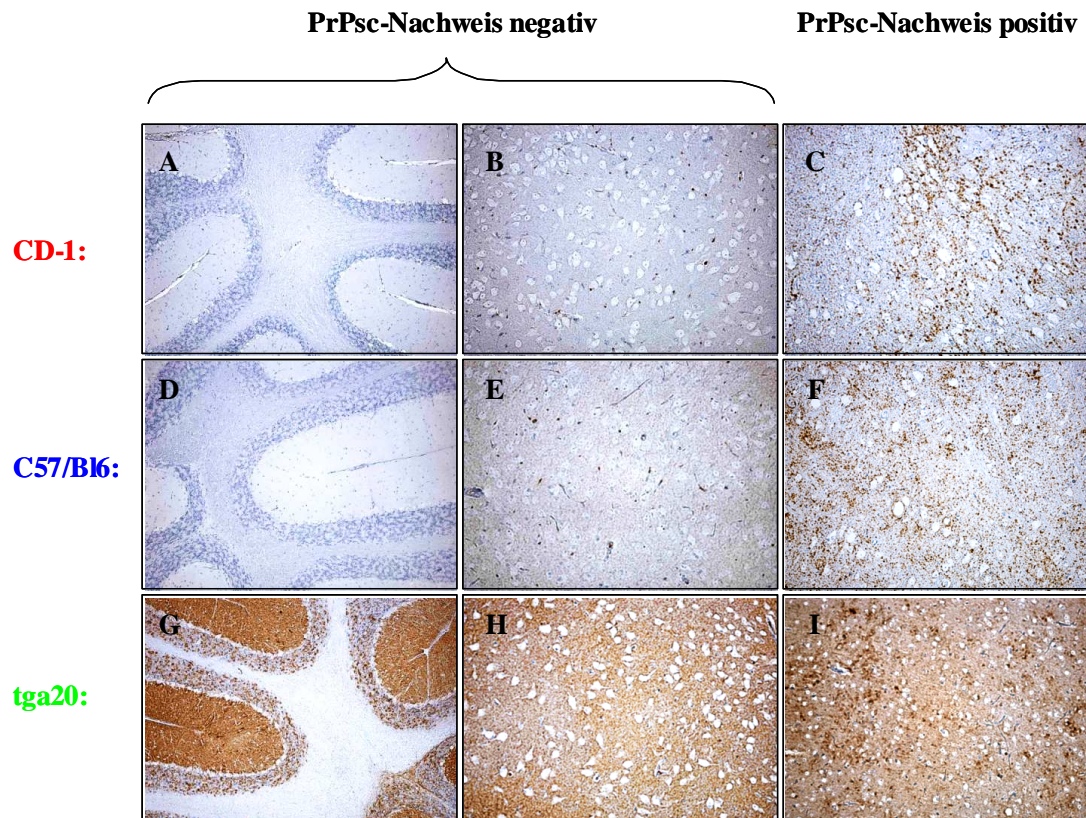


Abbildung 36: Unspezifische Hintergrundfärbung beim immunhistochemischen Nachweis von PrPsc mit dem monoklonalen Primärantikörper SAF84 in den Gehirnen der drei Mausstämme. A-C: CD-1-Mäuse: A+B: Nicht-inokulierte Tiere; C: Ic-inokuliertes Tier. D-F: C57/Bl6-Mäuse: D+E: Nicht-inokulierte Tiere; F: Ic-inokuliertes Tier. G-I: tga20-Mäuse: G+H: Nicht-inokulierte Tiere; I: Ic-inokuliertes Tier. Vergrößerungen: A, D, G: 10x; B, C, E, F, H, I: 20x.

Die Auswertung erfolgte, wie auch bei der Beurteilung der Vakuolisierung, nach dem in Kapitel 3.2.6.9 beschriebenen Schema. Da sich die histologischen Schnitte verschiedener Proben mehrfach während der aufwendigen immunhistochemischen Vorbehandlungen ablösten, war eine relativ große Zahl der Proben nicht auswertbar.

Zusätzlich zum immunhistochemischen Nachweis wurden Western Blot Analysen zum Nachweis der pathologischen Form des Prion-Proteins durchgeführt. Wie in Kapitel 3.2.7.1 beschrieben, wurde von den Gehirnhälften, die für die RNA-Isolierung in RNAlater fixiert worden waren, ein kleiner kranialer Anteil für die Western Blot Analyse verwendet. In

einzelnen Fällen kam ein kaudales Stück aus dem Bereich Kleinhirn/Medulla oblongata zur Auswertung (Kapitel 3.2.7.1, Tab. 1). Gehirnhomogenate von Kontrolltieren wurden sowohl mit als auch ohne Proteinase K (PK)-Verdau aufgetragen. Als Primärantikörper diente POM1 (Donofrio *et al.* 2005). Von den Gehirnhomogenaten, die in dieser Untersuchung negativ waren, wurde zusätzlich eine Natriumphosphorwolframat (NaPTA)-Fällung durchgeführt. Mit dieser Methode ist eine Aufreinigung von PrPsc aus Gehirngewebe möglich. Grundlage ist die selektive Fällung von PrPsc-Aggregaten; monomeres PrPc verbleibt im Überstand.

4.4.1 Intrazerebrale Inokulation (ic-Inokulation)

4.4.1.1 PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC)

Im präklinischen Krankheitsstadium konnten in den Gehirnen von Tieren des ersten Zeitwertes keine PrPsc-spezifischen Ablagerungen nachgewiesen werden, wobei in der Gruppe der CD-1-Mäuse zu diesem Zeitwert nur eines von vier Tieren (28a – Tier 3) auswertbar war (Ergebnisse nicht gezeigt). Bereits zum zweiten Zeitwert, also bei klinisch noch gesunden Mäusen und noch vor Auftreten TSE-spezifischer Vakuolen, zeigte sich in allen untersuchten Gehirnen der Wildtyp-Mäuse eine gering- bis mittelgradige Akkumulation von PrPsc vor allem im Bereich des Hirnstammes und in den Regionen des Cerebrums/ Diencephalons (Tab. 19, Abb. 37 A, B, D und E). Im Gegensatz dazu war neben dem fehlenden Nachweis von Vakuolen keine PrPsc-spezifische Markierung in den untersuchten Gehirnen der tga20-Gruppe erkennbar (Tab. 19, Abb. 37 C und F).

Dementsprechend wiesen auch die beiden Wildtyp-Mausgruppen des dritten präklinischen Zeitwertes in allen ausgewerteten Gehirnen bereits mittel- bis hochgradige PrPsc-typische feingranuläre Ablagerungen in allen untersuchten Regionen auf (Tab. 20, Abb. 38 A und B). Wie bereits beschrieben stand für diesen Zeitwert kein Material von tga20-Mäusen für die immunhistochemische Auswertung zur Verfügung.

präklinisches Stadium: 2. Zw	Nachweis					
	Vakuolen			PrPsc		
dpi - Tier Nr.	Gehirnregion			Gehirnregion		
	Cb	Hs	Ce/Di	Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1						
62 - Tier 1	--	-- *	+/-	--	++ *	+
" - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	++	++	++ *
" - Tier 3	--	+/-	--	++	++	+
" - Tier 4	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 62 - Tier 1 1%	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 62 - Tier 2 1%	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 62 - Tier 1	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 62 - Tier 2	--	-- *	-- *	--	-- *	--
Mausstamm: C57/Bl6						
61 - Tier 1	--	-- *	--	--	++	++
" - Tier 2	--	--	--	+++	++	++
" - Tier 3	--	--	--	--	++	++
" - Tier 4	--	--	--	+/-	++	+
Kontrolle 61 - Tier 1 1%	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 61 - Tier 2 1%	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 62 - Tier 1	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 62 - Tier 2	--	--	--	--	-- *	-- *
Mausstamm: tga20						
20 - Tier 1	--	--	--	--	--	--
" - Tier 2	--	--	--	--	n.a.	-- *
" - Tier 3	--	--	--	--	n.a.	-- *
" - Tier 4	--	--	+/-	--	--	--
Kontrolle 20 - Tier 1 1%	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 20 - Tier 2 1%	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 20 - Tier 1	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 20 - Tier 2	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.

Tabelle 19: Vergleich von Vakuolisierung und PrPsc-Akkumulation der Tiergruppen von CD-1-, C57/Bl6- und tga20-Mäusen des 2. Zeitwertes im präklinischen Stadium nach ic-Inokulation. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

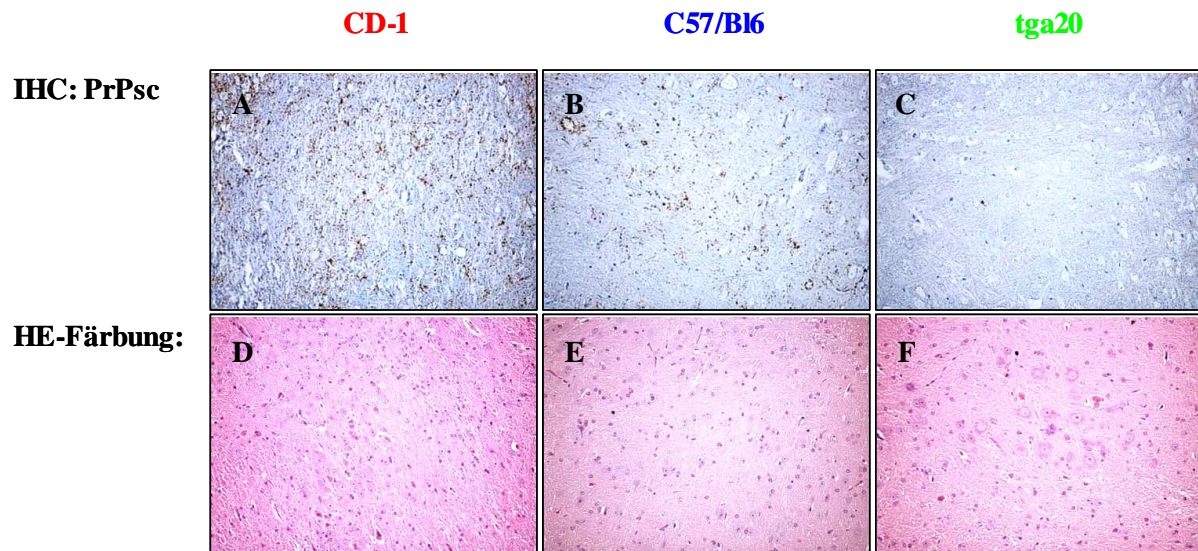


Abbildung 37: Immunhistochemische Markierung von PrPsc (A-C) ohne die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen (D-F: HE-Färbung) im Hirnstamm von klinisch unauffälligen Tieren (2. Zeitwert des präklinischen Krankheitsstadiums) der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach ic-Inokulation (Vergrößerung: 20x). A+D: 62 dpi – Tier 3; B+E: 61 dpi – Tier 2; C+F: 20 dpi – Tier 1.

Mit dem Einsetzen der ersten Scrapie-spezifischen Symptome konnte nun auch in allen untersuchten Gehirnproben der tga20-Mäuse PrPsc-Ablagerungen nachgewiesen werden. Diese waren jedoch im Vergleich zu der immunhistologischen Markierung der beiden Wildtyp-Mausstämme, bei denen bereits mittel- bis hochgradige PrPsc-Akkumulationen auftraten, nur gering- bis mittelgradig ausgeprägt (Tab. 20, Abb. 38 D bis F).

Erst bei schwer kranken Tieren (spätes klinisches Krankheitsstadium) war das immunhistochemische Bild in den Gehirnen der transgenen Mäuse ähnlich dem der Wildtyp-Mäuse, bei denen in allen untersuchten Bereichen des Gehirns PrPsc mittel- bzw. hochgradig nachzuweisen war (Tab. 20, Abb. 38 G bis I). Im Bereich des Cerebellums und des Cerebrums/Diencephalons wurde bei tga20-Mäusen teilweise weniger PrPsc akkumuliert als in den entsprechenden Regionen der Gehirne der Wildtyp-Mausstämme (Tab. 20, Abb. 39 und 40). Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen, in den Gehirnen der tga20-Mäuse sowohl die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen als auch eine Astrozytose im Verlauf der Erkrankung insgesamt schwächer ausgeprägt waren. Während bei hochgradig kranken Wildtyp-Mäusen der Nachweis von PrPsc immer auch mit dem Nachweis von TSE-spezifischen Vakuolen einher ging, war im Kleinhirn von tga20-Mäusen in den meisten Fällen der PrPsc-Nachweis ohne die Ausbildung von Vakuolen positiv (Abb. 40).

präklinisches Stadium: 3. Zw					frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium				
dpi - Tier Nr.		Gehirnregion			dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		
		Cb	Hs	Ce/Di			Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1													
90 - Tier 1		++	++	++	119 - Tier 1		n.a.	n.a.	+++	142 - Tier 1		++	+++
" - Tier 2		+++	++	++	" - Tier 2		++	+++	+++	" - Tier 2		+++	+++
" - Tier 3		n.a.	n.a.	n.a.	121 - Tier 3		n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 3		+++	+++
92 - Tier 4		++ *	+++ *	+++ *	" - Tier 4		+++	++	+++	149 - Tier 4		n.a.	n.a.
Kontrolle 92 - Tier 1		n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 119 - Tier 1		--	--	--	Kontrolle 130 - Tier 1		--	--
Kontrolle 92 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 119 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 140 - Tier 2		n.a.	n.a.
Mausstamm: C57/Bl6													
93 - Tier 1		+++	++	++	97 - Tier 1		n.a.	++	++	149 - Tier 1		+++	+++
" - Tier 2		+++	+++	++	" - Tier 2		+++	++	++	157 - Tier 2		n.a.	n.a.
" - Tier 3		+++	+++	++	98 - Tier 3		+++	+++	+++	" - Tier 3		n.a.	n.a.
" - Tier 4		+++	++	+++	" - Tier 4		+++	++	++	158 - Tier 4		++	+++
Kontrolle 93 - Tier 1		--	--	--	Kontrolle 98 - Tier 1		--	--	-- *	Kontrolle 146 - Tier 1		n.a.	n.a.
Kontrolle 93 - Tier 2		-- *	n.a.	--	Kontrolle 98 - Tier 2		--	--	-- *	Kontrolle 157 - Tier 2		--	--
Mausstamm: tga20													
40 - Tier 1		n.a.	n.a.	n.a.	48 - Tier 1		+/-	+	+	57 - Tier 1		++	++ *
" - Tier 2		n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 2		+	++	++	57 - Tier 2		+	++
41 - Tier 3		n.a.	n.a.	n.a.	49 - Tier 3		n.a.	n.a.	n.a.	61 - Tier 3		n.a.	n.a.
42 - Tier 4		n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 4		n.a.	++ *	++	64 - Tier 4		++	++
										62 - Tier 5		+++	+++
										Kontrolle 61 - Tier 1 1%		--	--
					Kontrolle 48 - Tier 1 1%		n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 61 - Tier 2 1%		--	--
					Kontrolle 48 - Tier 2 1%		n.a.	-- *	--	Kontrolle 61 - Tier 1		n.a.	--
Kontrolle 40 - Tier 1		--	--	--	Kontrolle 48 - Tier 1		n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 61 - Tier 2		--	--
Kontrolle 40 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 48 - Tier 2		--	--	--	Kontrolle 62 - Tier 1		--	--

Tabelle 20: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den drei untersuchten Gehirnregionen nach ic-Inokulation im präklinischen Krankheitsstadium (3. Zeitwert) sowie im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

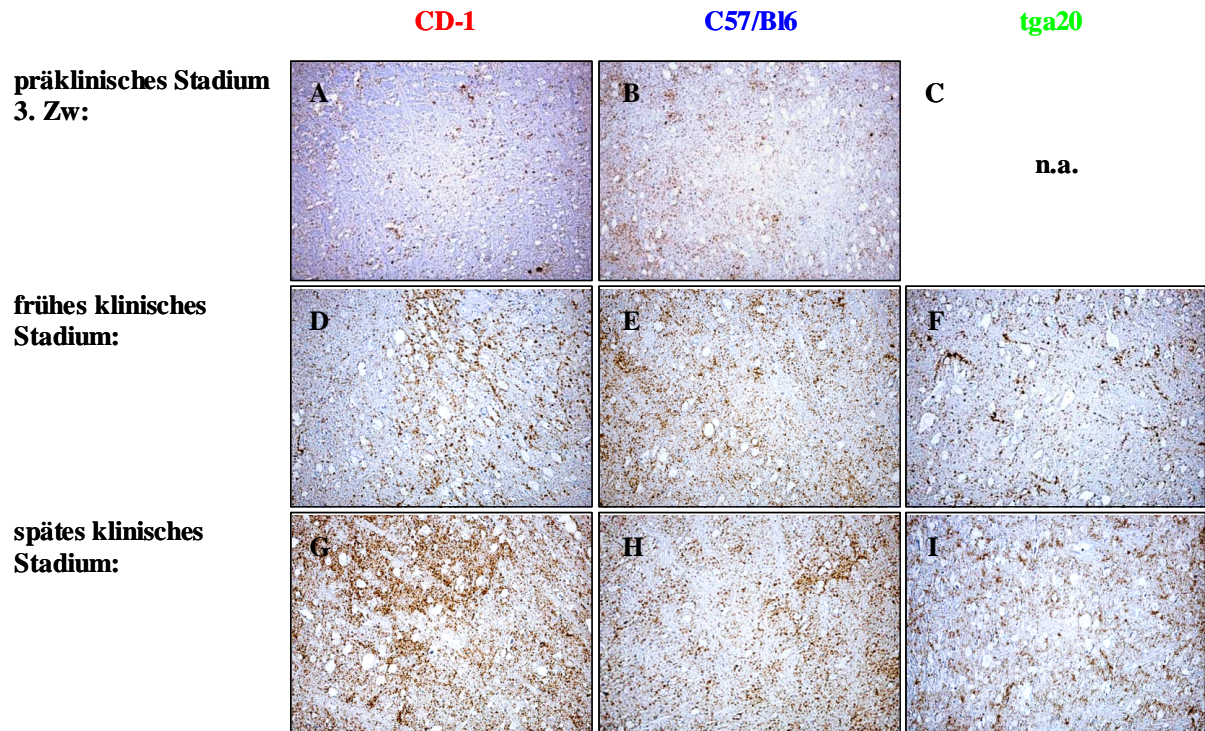


Abbildung 38: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc in den Gehirnen der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den unterschiedlichen Krankheitsstadien nach ic-Inokulation (Hirnstamm, Vergrößerung: 20x). A: 90 dpi – Tier 1; B: 93 dpi – Tier 1; D: 121 dpi – Tier 4; E: 98 dpi – Tier 3; F: 48 dpi – Tier 2; G: 142 dpi – Tier 1; H: 149 dpi – Tier 1; 62 dpi – Tier 5.

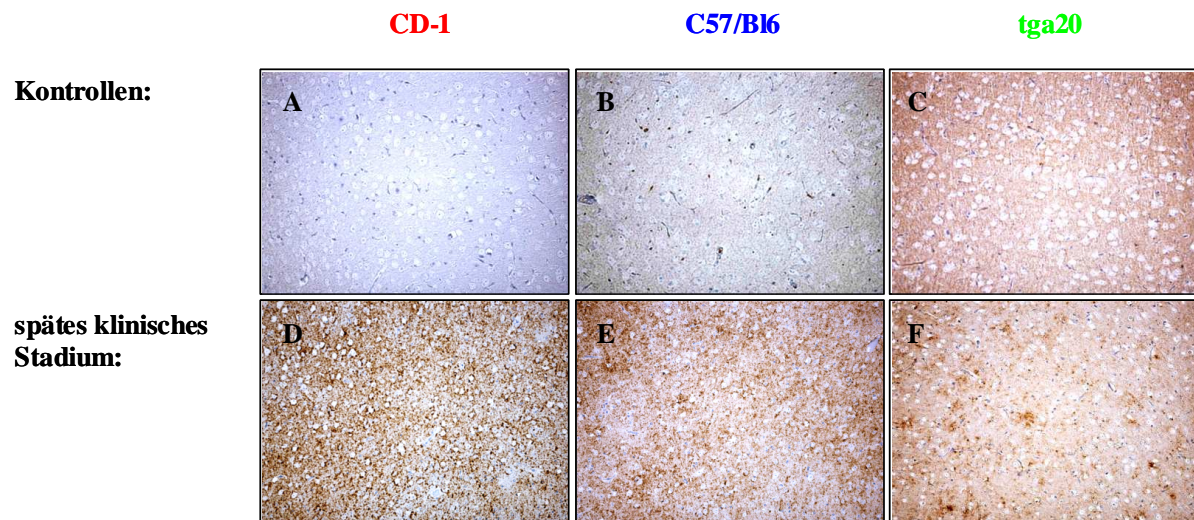


Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc in den Gehirnen der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im späten klinischen Krankheitsstadium nach ic-Inokulation (Cortex, Vergrößerung: 20x). A-C: Kontrollen; D: 142 dpi – Tier 3; E: 149 dpi – Tier 1; F: 64 dpi – Tier 4.

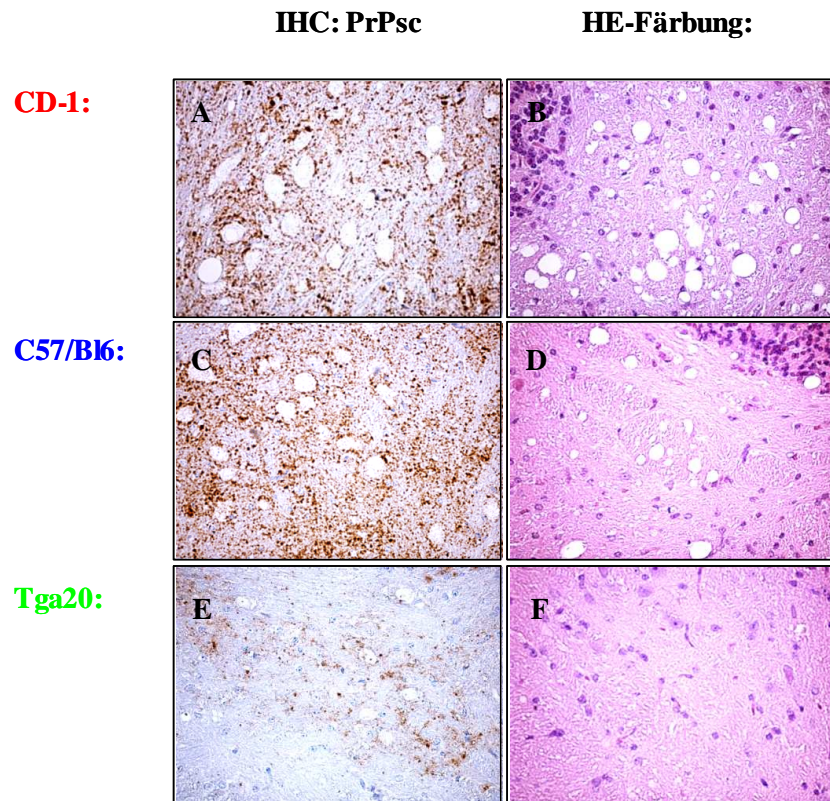


Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc (A,C,E) und Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen (B,D,F: HE-Färbung) im Kleinhirn von Tieren der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im späten klinischen Krankheitsstadium nach ic-Inokulation (Vergrößerung: 40x). A+B: 142 dpi – Tier 1; C+D: 149 dpi – Tier 1; E+F: 57 dpi – Tier 2.

4.4.1.2 Western Blot

Analog zu den Ergebnissen der PrPsc-spezifischen IHC konnte zum ersten Zeitwert des prä-klinischen Stadiums auch nach NaPTA-Fällung in keiner Tiergruppe PrPsc nachgewiesen werden (Abb. 41 A und B). Auch im weiteren Verlauf dieses Stadiums waren die Resultate nach Western Blot Analyse ähnlich denen der immunhistochemischen Untersuchung. Alle untersuchten Proben der Wildtyp-Mäuse waren in der Gruppe des zweiten Zeitwertes mit NaPTA-Fällung und zum dritten Zeitwert bereits ohne NaPTA-Fällung deutlich positiv für PrPsc, während in den Proben der tga20-Mäuse auch nach NaPTA-Fällung keine bzw. sehr schwache PrPsc spezifische Banden im Western Blot nachweisbar waren (Abb. 41 A und B).

Im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium zeigten sich, wie erwartet und in Korrelation mit den Befunden aus der immunhistochemischen Untersuchung, in allen Gehirnproben sowohl der Wildtyp- als auch der transgenen Mäuse ohne NaPTA-Fällung die für PrPsc typischen Banden (Abb. 42).

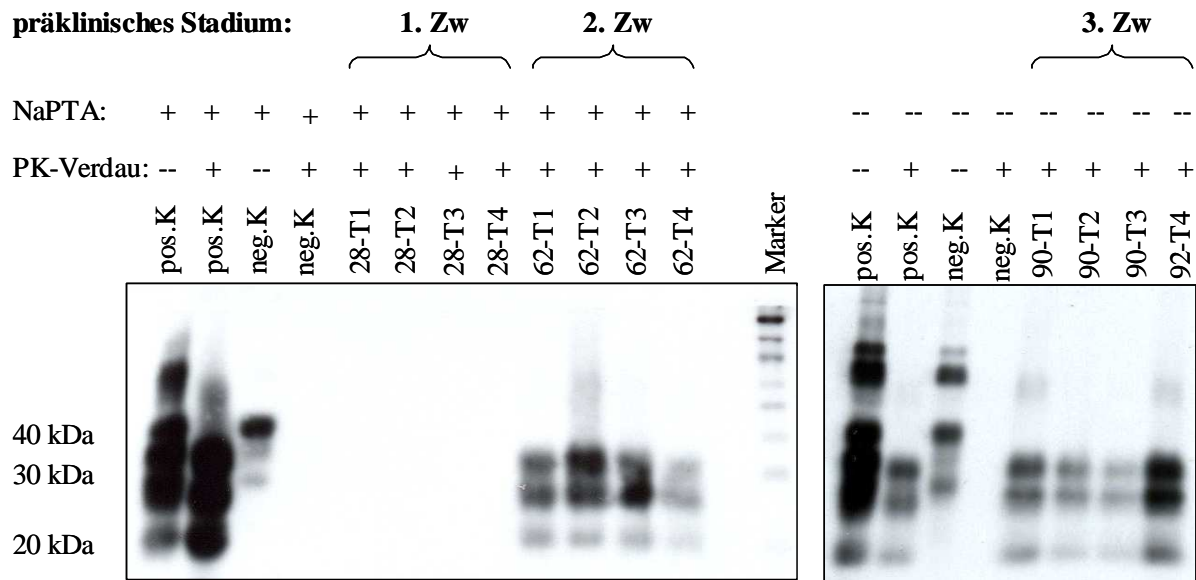
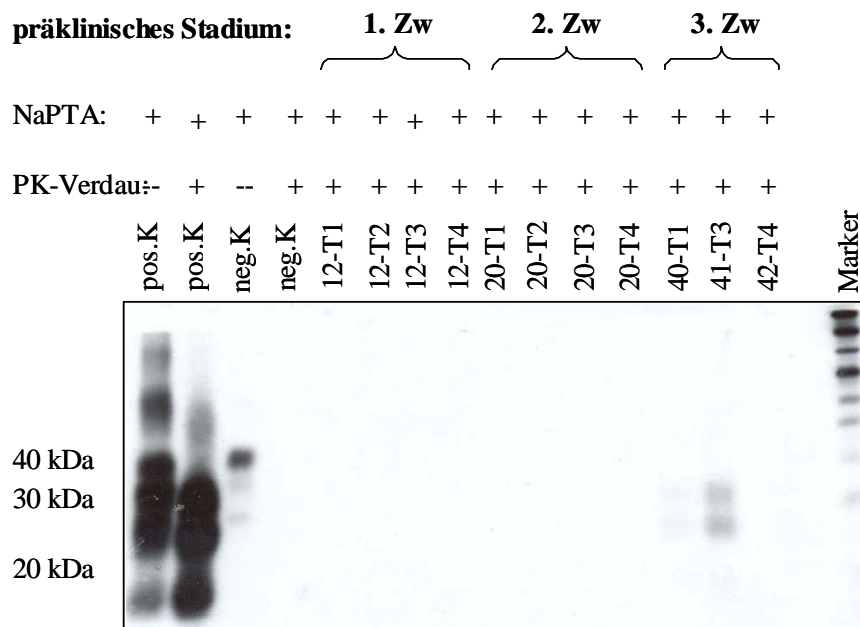
A**B**

Abbildung 41: Western Blot Analyse: Vergleich der CD-1-Wildtyp-Mäusen (A) mit den tga20-Mäusen (B) im präklinischen Stadium nach ic-Inokulation. A: Proben der CD-1-Mäuse sind nach NaPTA-Fällung zum 2. Zeitwert deutlich positiv für PrPsc; zum 3. Zeitwert sind die PrPsc-typischen Banden bereits ohne NaPTA-Fällung in allen Proben nachweisbar. B: In den Proben der tga20-Mäuse ist PrPsc erst zum 3. Zeitwert nach NaPTA-Fällung und nur bei zwei Tieren schwach nachweisbar. Zw = Zeitwert; PK = Proteinase K; T = Tier; K = Kontrolle; kDa = Kilodalton.

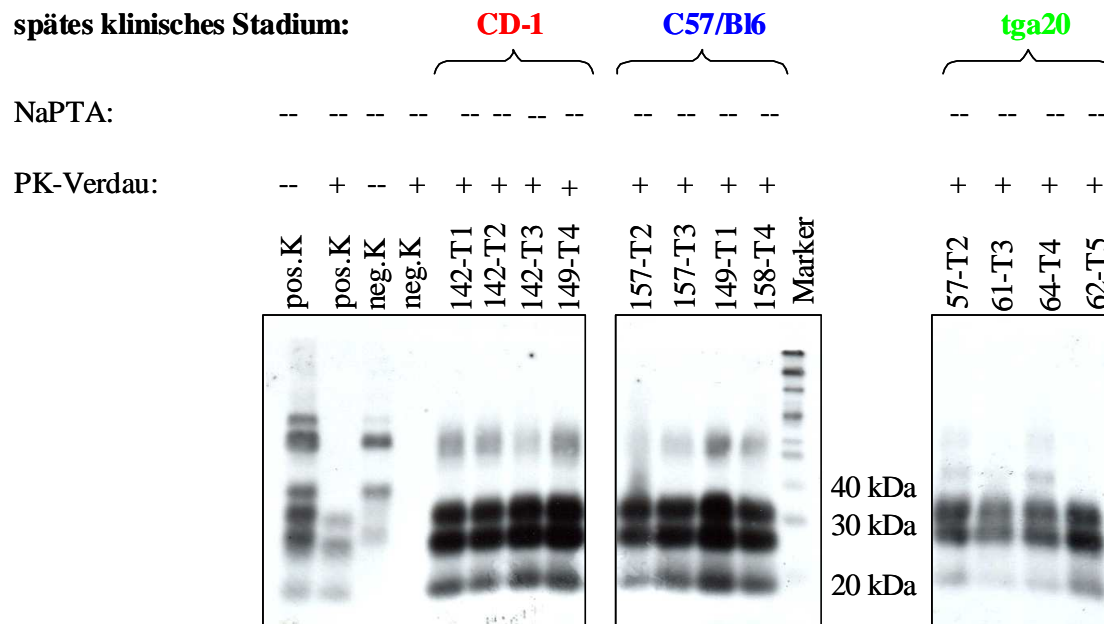


Abbildung 42: Western Blot Analyse: Vergleich der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) im späten klinischen Krankheitsstadium nach ic-Inokulation: In allen Proben der drei Mausstämme zeigten sich ohne NaPTA-Fällung die für PrPsc spezifischen Banden. PK = Proteinase K; T = Tier; K = Kontrolle; kDa = Kilo-dalton.

4.4.2 Intraperitoneale Inokulation (ip-Inokulation)

4.4.2.1 PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC)

Zu Beginn des präklinischen Stadiums (1. Zeitwert) war die Gruppe der CD-1-Mäuse nicht auswertbar; die histologischen Schnitte dieser Tiergruppe lösten sich während der aufwendigen immunhistochemischen Behandlung immer wieder ab. In den beiden anderen Gruppen waren keine PrPsc-spezifischen Ablagerungen in den Gehirnprouben nachzuweisen (Ergebnisse nicht gezeigt). Zum zweiten Zeitwert dieses Stadiums wies nur die Gruppe der CD-1-Mäuse PrPsc-spezifische Ablagerungen in allen untersuchten Regionen im Gehirnschnitt auf (Tab. 21). Auch hier war, ähnlich wie nach ic-Inokulation, in einigen Fällen PrPsc nachweisbar bevor TSE-spezifische Vakuolen auftraten (Abb. 43 A und D).

präklinisches Stadium: 2. Zw	Nachweis					
	Vakuolen			PrPsc		
dpi - Tier Nr.	Gehirnregion			Gehirnregion		
	Cb	Hs	Ce/Di	Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1						
91 - Tier 1	--	+/-	--	+	+	+ *
" - Tier 2	--	++	--	++ *	n.a.	++
" - Tier 3	n.a.	--	--	n.a.	+	+
" - Tier 4	--	+/-	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 92 - Tier 1	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 92 - Tier 2	--	--	--	--	--	--
Mausstamm: C57/Bl6						
92 - Tier 1	--	--	--	--	--	-- *
" - Tier 2	--	--	-- *	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 3	--	--	-- *	--	+/-	--
" - Tier 4	--	--	-- *	--	--	-- *
Kontrolle 93 - Tier 1	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 93 - Tier 2	--	--	--	-- *	n.a.	--
Mausstamm: tga20						
41 - Tier 1	--	-- *	-- *	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 2	n.a.	--	--	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 3	--	--	--	--	+/-	+/-
" - Tier 4	--	--	--	--	+/-	+/-
Kontrolle 40 - Tier 1	--	--	--	--	--	--
Kontrolle 40 - Tier 2	--	--	--	--	--	--

Tabelle 21: Vergleich von Vakuolisierung und PrPsc-Akkumulation der Tiergruppen von CD-1-, C57/Bl6- und tga20-Mäusen des 2. Zeitwertes im präklinischen Stadium nach ip-Inokulation. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

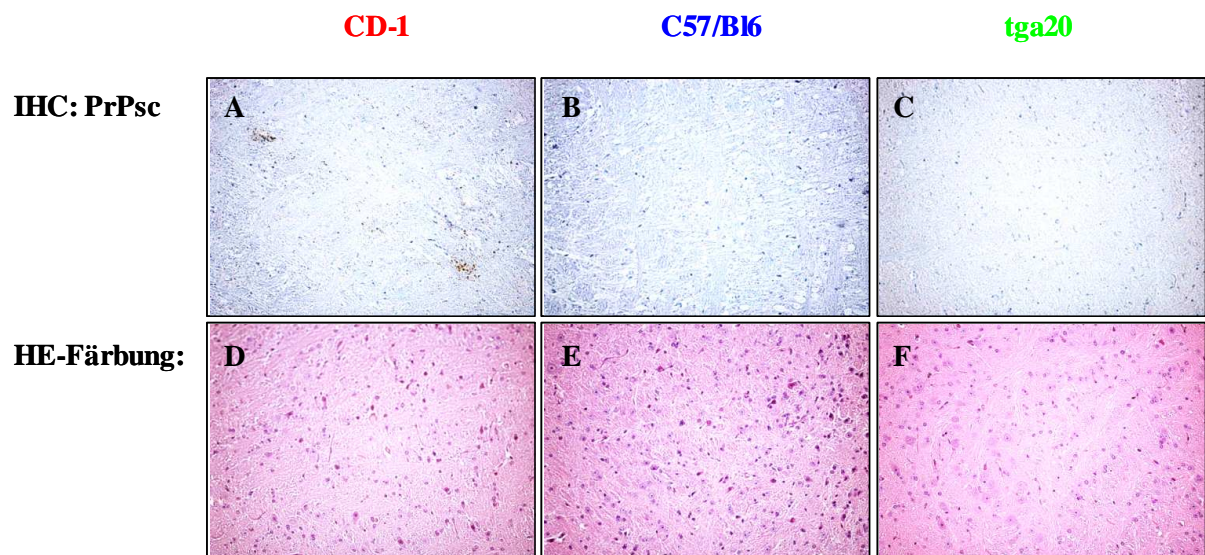


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc (A-C) ohne die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen (D-F: HE-Färbung) im Hirnstamm von klinisch unauffälligen Tieren (2. Zeitwert des präklinischen Krankheitsstadiums) der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) nach ip-Inokulation (Vergrößerung: 20x). A+D: 91 dpi – Tier 3; B+E: 92 dpi – Tier 1; C+F: 41 dpi – Tier 3.

Zum dritten Zeitwert des präklinischen Stadiums wiesen nun, wie auch nach ic-Inokulation, alle Wildtyp-Mäuse mittel- bis hochgradige PrPsc-Ablagerungen in allen untersuchten Gehirnregionen auf. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen CD-1- und C57/Bl6-Mäusen aufgezeigt werden (Tab. 22, Abb. 44 A und B). In der Gruppe der tga20-Mäuse zeigten sich nur bei einem der zwei ausgewerteten Tiere im Bereich des Hirnstammes geringgradige, feingranuläre Ablagerungen von PrPsc (Tab. 22).

Wie auch nach ic-Inokulation zeigten sich bei klinisch kranken Tieren aller drei Mausstämme PrPsc-Ablagerungen in allen untersuchten Gehirnbereichen (Tab. 22, Abb. 44 D bis I). Dabei wiesen tga20-Mäuse vor allem in den Regionen des Cerebrums/Diencephalons wesentlich weniger PrPsc auf als die beiden Wildtyp-Mausstämme. Wie auch nach ic-Inokulation war bei einigen ip-inokulierten tga20-Mäusen im späten klinischen Krankheitsstadium PrPsc ohne die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen nachweisbar, während bei hochgradig erkrankten Wildtyp-Mäusen der Nachweis von PrPsc auch immer mit einer deutlichen Vakuolisierung einher ging.

präklinisches Stadium: 3. Zw				frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium			
dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		dpi - Tier Nr.		Gehirnregion		dpi - Tier Nr.		Gehirnregion	
	Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1											
168 - Tier 1	+++	+++	+++	168 - Tier 1	+++	+++	+++	188 - Tier 1	++ *	+++	+++
" - Tier 2	+++	+++	++	175 - Tier 2	+++	+++	+++	" - Tier 2	+++	+++ *	++ *
" - Tier 3	+++	++	++	" - Tier 3	++ *	+++	+++ *	195 - Tier 3	+++	+++	+++
				" - Tier 4	++	++	+++	224 - Tier 4	+++	+++	++
								Kontrolle 190 - Tier 1	--	--	--
Kontrolle 168 - Tier 1	--	--	--					Kontrolle 190 - Tier 2	--	--	--
Kontrolle 168 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 175 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
								Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: C57/Bl6											
162 - Tier 1	+++	++	++	162 - Tier 1	+++	+++	++	195 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 2	++	+++	++	182 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	204 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 3	+++	+++	++	" - Tier 3	+++	+++	+++	" - Tier 3	+++	+++	+++
" - Tier 4	+++	+++	+++	" - Tier 4	n.a.	n.a.	n.a.	211 - Tier 4	n.a.	n.a.	n.a.
								212 - Tier 5	++	+++	+++
Kontrolle 162 - Tier 1	--	--	--	Kontrolle 182 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 200 - Tier 1	--	--	--
Kontrolle 162 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 182 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 208 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: tga20											
62 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	76 - Tier 1	++	++	+	80 - Tier 1	++	++	+
" - Tier 2	--	--	--	" - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	" - Tier 2	++	++	+
" - Tier 3	n.a.	n.a.	n.a.	77 - Tier 3	+++	+++	+	81 - Tier 3	+/-	+++	+
" - Tier 4	--	+	+/- *	" - Tier 4	++	++	+	84 - Tier 4	--	++	+
Kontrolle 61 - Tier 1	n.a.	--	--								
Kontrolle 61 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 76 - Tier 1	n.a.	--	--	Kontrolle 84 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 62 - Tier 1	--	--	--	Kontrolle 76 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 84 - Tier 2	--	--	--

Tabelle 22: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den drei untersuchten Gehirnregionen nach ip-Inokulation im präklinischen Krankheitsstadium (3. Zeitwert) sowie im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

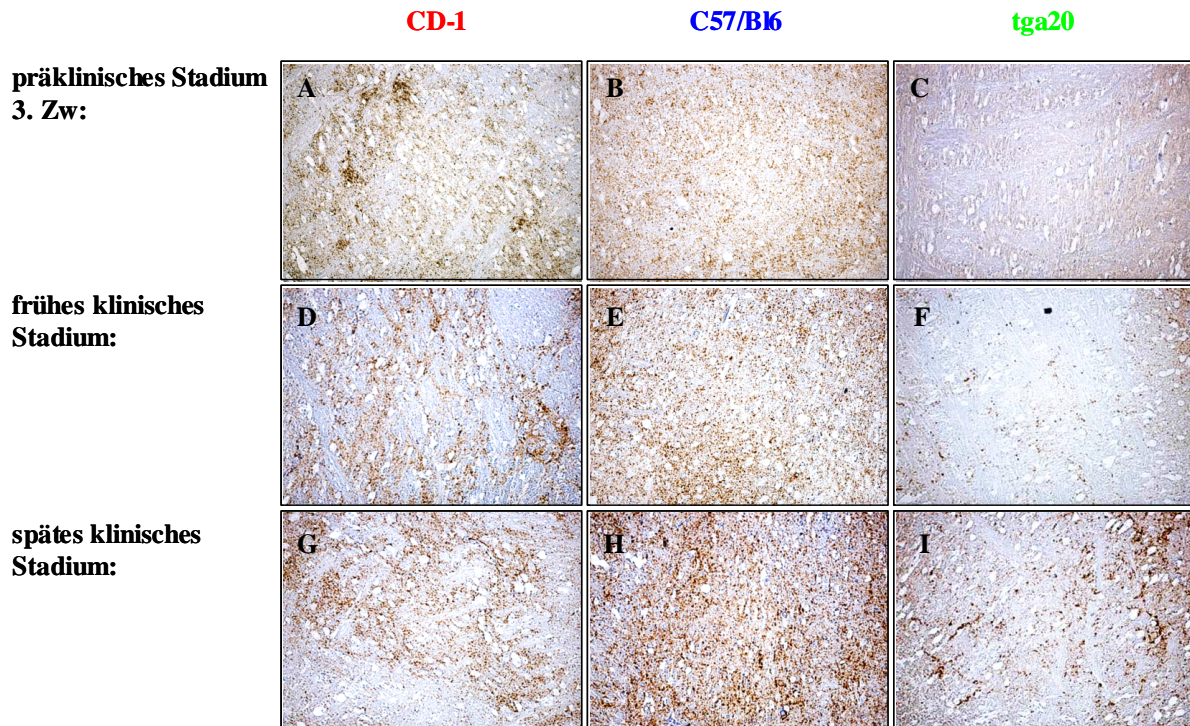


Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc in den Gehirnen der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den unterschiedlichen Krankheitsstadien nach ip-Inokulation (Hirnstamm, Vergrößerung: 20x). A: 168 dpi – Tier 1; B: 162 dpi – Tier 3; C: 62 dpi – Tier 2; D: 175 dpi – Tier 2; E: 182 dpi – Tier 3; F: 77 dpi – Tier 4; G: 195 dpi – Tier 3; H: 212 dpi – Tier 5; I: 80 dpi – Tier 1.

4.4.2.2 Western Blot

Bei den Tieren aus den ersten beiden präklinischen Zeitwerten war PrPsc wie auch nach immunhistochemischer Markierung nur bei CD-1-Mäusen nachweisbar. Die für PrPsc typischen Banden im Western Blot konnten jedoch nur bei einer der vier getesteten CD-1-Mäuse (91a – Tier 2) nach NaPTA-Fällung gezeigt werden (Abb. 45 A). Zum dritten Zeitwert waren analog zu den immunhistochemischen Untersuchungen alle Tiere der beiden Wildtyp-Mausgruppen bereits ohne NaPTA-Fällung positiv für PrPsc (Abb. 45 B). Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe der tga20-Mäuse präklinisch auch nach NaPTA-Fällung keine PrPsc-spezifischen Banden in der Western Blot Analyse nachweisbar (Abb. 45 C; Tier 3 und 4 nicht gezeigt). Mittels IHC konnten zwei der vier Tiere dieser Gruppe ausgewertet werden. Hierbei wies nur eines der beiden Tiere (62a – Tier 4) geringgradige PrPsc-Ablagerungen im Hirnstamm auf (Tab. 22).

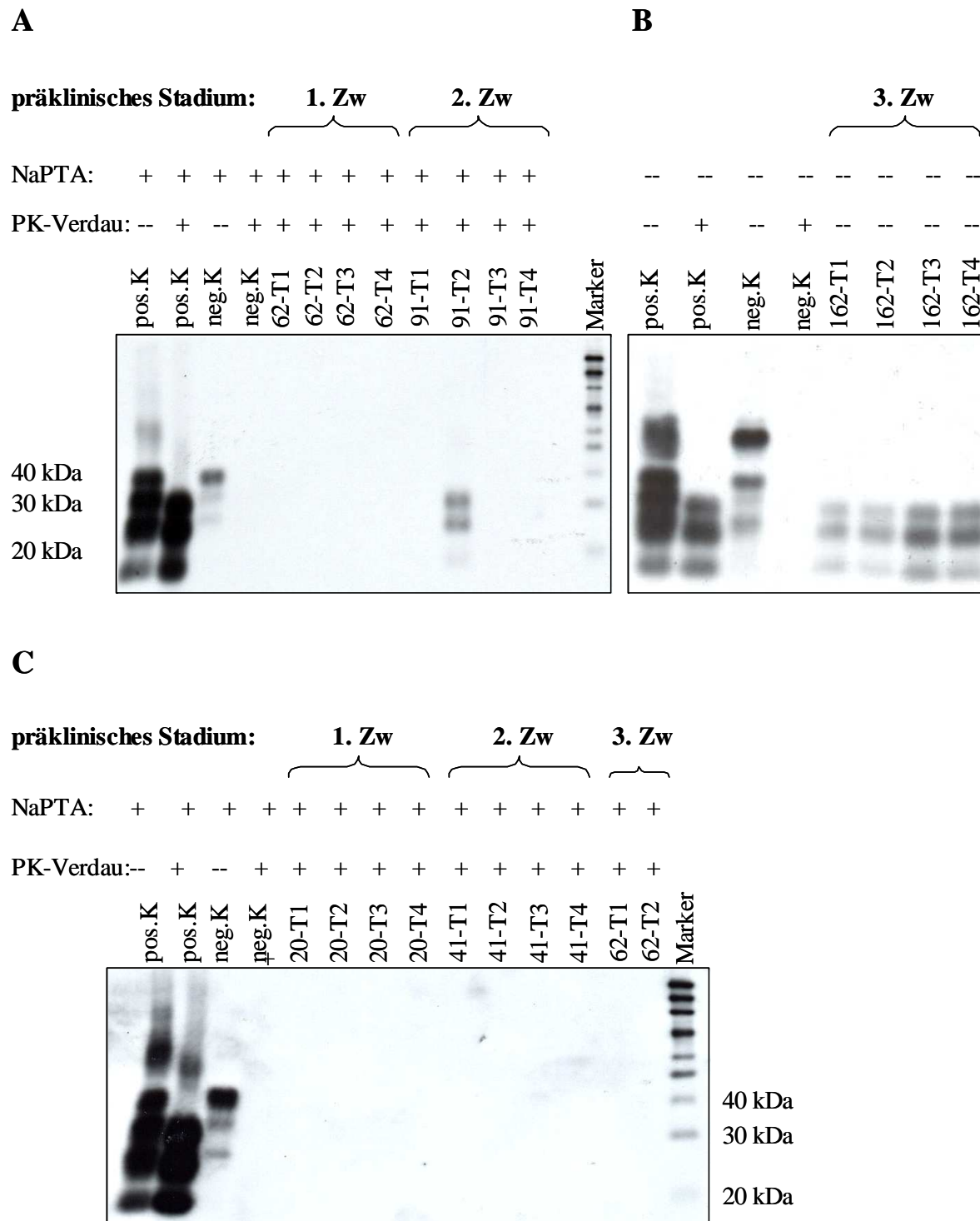
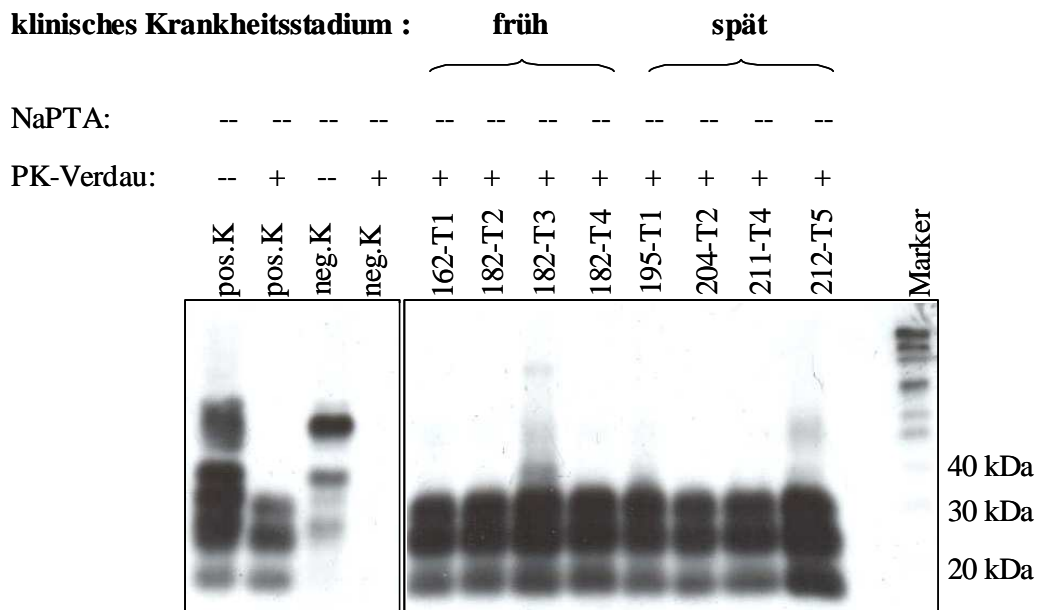


Abbildung 45: Western Blot Analyse: Vergleich der Proben von Wildtyp-Mäusen (A+B) mit den Proben von tga20-Mäusen (C) im präklinischen Stadium nach ip-Inokulation. A: CD-1-Mäuse: Ein Tier ist nach NaPTA-Fällung bereits zum 2. Zeitwert deutlich positiv für PrPsc (91a – Tier 2). B: C57/Bl6-Mäuse: Zum 3. Zeitwert sind präklinisch auch ohne NaPTA-Fällung die PrPsc-typischen Banden nachweisbar. C: tga20-Mäuse: PrPsc ist auch nach NaPTA-Fällung nicht nachweisbar. Zw = Zeitwert; PK = Proteinase K; T = Tier; K = Kontrolle; kDa = Kilodalton.

Auch nach Einsetzen der klinischen Symptome bestätigte sich die Tendenz der immun-histochemischen Auswertung, dass in den Gehirnen der transgenen Mäuse weniger PrPsc akkumuliert wird als in den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen. In allen Gehirnen klinisch

kranker Wildtyp-Mäuse war PrPsc auch ohne NaPTA deutlich nachweisbar (Abb. 46 A), während die Proben der tga20-Mäuse erst nach NaPTA-Fällung und nur in zwei von drei (frühes klinisches Stadium) bzw. in einem von vier (spätes klinisches Stadium) Fällen schwach positiv waren (Abb. 46 B).

A



B

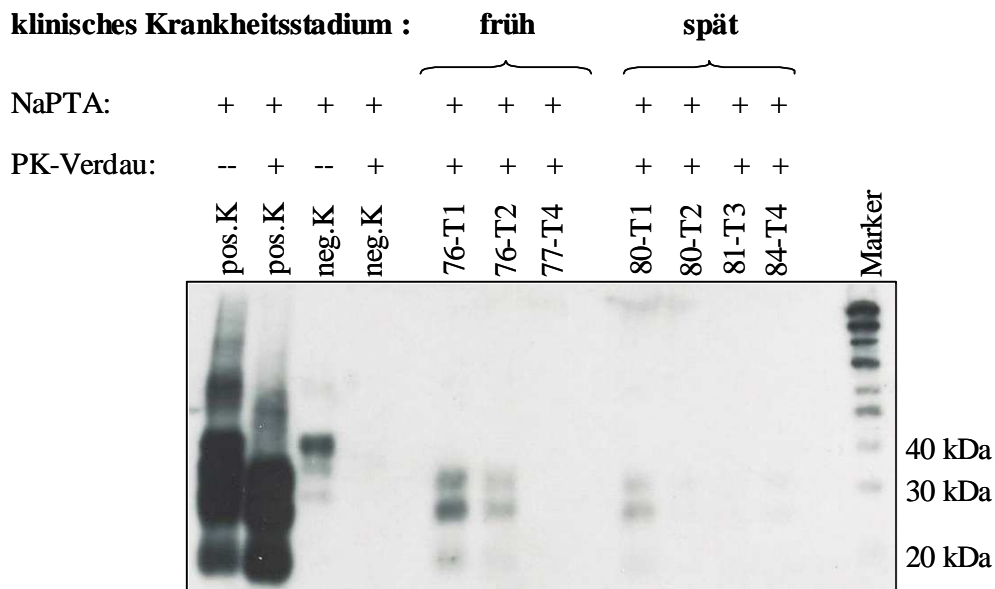


Abbildung 46: Western Blot Analyse: Vergleich der Proben von Wildtyp-Mäusen (A) mit den Proben von tga20-Mäusen (B) im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium nach ip-Inokulation. A: C57/Bl6-Mäuse: Alle Proben zeigen ohne NaPTA-Fällung deutliche, für PrPsc spezifische Banden. B: tga20-Mäuse: Auch nach NaPTA-Fällung sind PrPsc-spezifische Banden nur schwach und nicht in allen Proben nachweisbar. Zw = Zeitwert; PK = Proteinase K; T = Tier; K = Kontrolle; kDa = Kilodalton.

4.4.3 Orale Inokulation

4.4.3.1 PrPsc-Nachweis nach Immunhistochemie (IHC)

Nach oraler Inokulation zeigten sich präklinisch in den Gehirnen von CD-1- und tga20-Mäusen keine PrPsc-spezifischen Ablagerungen. In den Gehirnen der C57/Bl6-Mäuse war bei zwei Tieren PrPsc nachweisbar. Nach 166 dpi wies Tier 3 geringgradige PrPsc Akkumulationen im Hirnstamm sowie in den Regionen des Cerebrums/Diencephalons auf. In den vorherigen Untersuchungen waren bei diesem Tier weder TSE-spezifische Vakuolen noch eine Astrozytose nachweisbar (Abb. 47). Auch klinisch war dieses Tier unauffällig gewesen. Wie nach ic- und ip-Inokulation konnte somit auch nach oraler Verabreichung von RML präklinisch PrPsc ohne die Ausbildung von Vakuolen nachgewiesen werden. Nach 212 Tagen war bei Tier 2 eine mittel- bis hochgradige PrPsc-Akkumulation in allen untersuchten Gehirnbereichen nachweisbar. Bei diesem Tier zeigten sich zusätzlich TSE-spezifische Vakuolen sowie eine Astrozytose (Abb. 48). Interessanterweise war dieses Tier ebenfalls klinisch unauffällig gewesen.

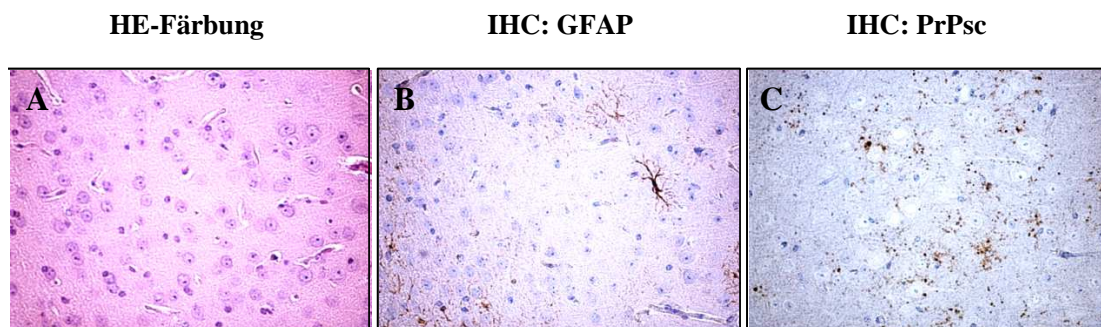


Abbildung 47: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc (C) ohne die Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen (A) und Astrozytose (B) bei einer klinisch unauffälligen C57/Bl6-Maus nach oraler Inokulation: 166 dpi – Tier 3 (Cortex; Vergrößerung: 40x).

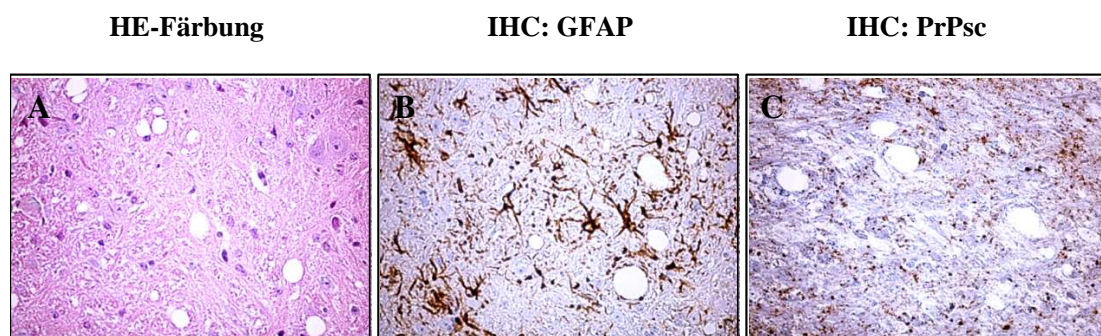


Abbildung 48: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc (C) und GFAP (B) in Anwesenheit von TSE-spezifischen Vakuolen (A) bei einer klinisch unauffälligen C57/Bl6-Maus nach oraler Inokulation: 212 dpi - Tier 2 (Hirnstamm; Vergrößerung: 40x).

frühes klinisches Stadium				spätes klinisches Stadium			
dpi - Tier Nr.	Gehirnregion			dpi - Tier Nr.	Gehirnregion		
	Cb	Hs	Ce/Di		Cb	Hs	Ce/Di
Mausstamm: CD-1							
210 - Tier 1 (1%)	+++	+++ *	++ *	237 - Tier 1 (1%)	++	+++	+++
" - Tier 2 "	n.a.	n.a.	n.a.	257 - Tier 1 "	n.a.	n.a.	n.a.
" - Tier 3 "	+++	+++	++	210 - Tier 1 (10%)	n.a.	+++ *	++ *
" - Tier 4 "	+++	++	+++	220 - Tier 2 "	n.a.	n.a.	n.a.
175 - Tier 1 (10%)	++	++	++	235 - Tier 3 "	n.a.	n.a.	n.a.
188 - Tier 2 "	++	++	++	260 - Tier 4 "	n.a.	n.a.	n.a.
200 - Tier 3 "	+++	+++	++				
215 - Tier 4 "	+++	+++	++				
Kontrolle 190 - Tier 1	--	--	--				
Kontrolle 190 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 210 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 210 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 237 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: C57/Bl6							
262 - Tier 1 (1%)	+++	+++	+++	226 - Tier 1 (1%)	n.a.	n.a.	+++
				252 - Tier 1 "	+++	+++	+++
				268 - Tier 1 "	+++	+++	+++
				Kontrolle 226 - Tier 1	--	--	--
Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 262 - Tier 2	--	--	--
Kontrolle 262 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.	Kontrolle 262 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Mausstamm: tga20							
142 - Tier 1 (1%)	+++	++	+	139 - Tier 1 (1%)	+++	++ *	+
153 - Tier 2 "	++	++	+	145 - Tier 2 "	+++	+++	+ *
75 - Tier 1 (10%)	n.a.	n.a.	n.a.	95 - Tier 1 (10%)	++	+++	+
140 - Tier 2 "	n.a.	n.a.	n.a.	109 - Tier 2 "	n.a.	n.a.	n.a.
145 - Tier 3 "	++	++	++	137 - Tier 3 "	++	+++	+ *
Kontrolle 76 - Tier 1	n.a.	--	--				
Kontrolle 76 - Tier 2	--	--	--	Kontrolle 90 - Tier 1	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 142 - Tier 1	--	--	--	Kontrolle 90 - Tier 2	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle 153 - Tier2	--	--	--	Kontrolle 142 - Tier 1	--	--	--

Tabelle 23: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc der einzelnen Tiere der drei Mausstämme (CD-1, C57/Bl6 und tga20) in den drei untersuchten Gehirnregionen nach oraler Inokulation im frühen und späten klinischen Krankheitsstadium. Zw = Zeitwert; dpi = Tage nach Inokulation; Nr. = Nummer; n.a. = nicht auswertbar; * = Lokalisation begrenzt auswertbar.

Im weiteren Krankheitsverlauf war PrPsc in den Gehirnen von klinisch kranken Tieren in allen untersuchten Regionen nachweisbar (Tab. 23). Auch in den Gehirnen der tga20-Mäuse konnten teilweise hochgradige PrPsc-Ablagerungen im Bereich des Kleinhirns und des Hirnstammes festgestellt werden. Die Regionen des Cerebrums/Diencephalons wiesen verglichen mit den Gehirnen beider Wildtyp-Stämme allerdings deutlich weniger PrPsc auf (Tab. 23, Abb. 49). Auch hier zeigten sich bei tga20-Mäusen des späten klinischen Krankheitsstadiums im Bereich des Cerebellums und des Cerebrums/Diencephalons PrPsc-Akkumulationen ohne die Anwesenheit TSE-spezifischer Vakuolen, während in den Gehirnen der beiden Wildtyp-Mausstämme beide Parameter korrelierten.

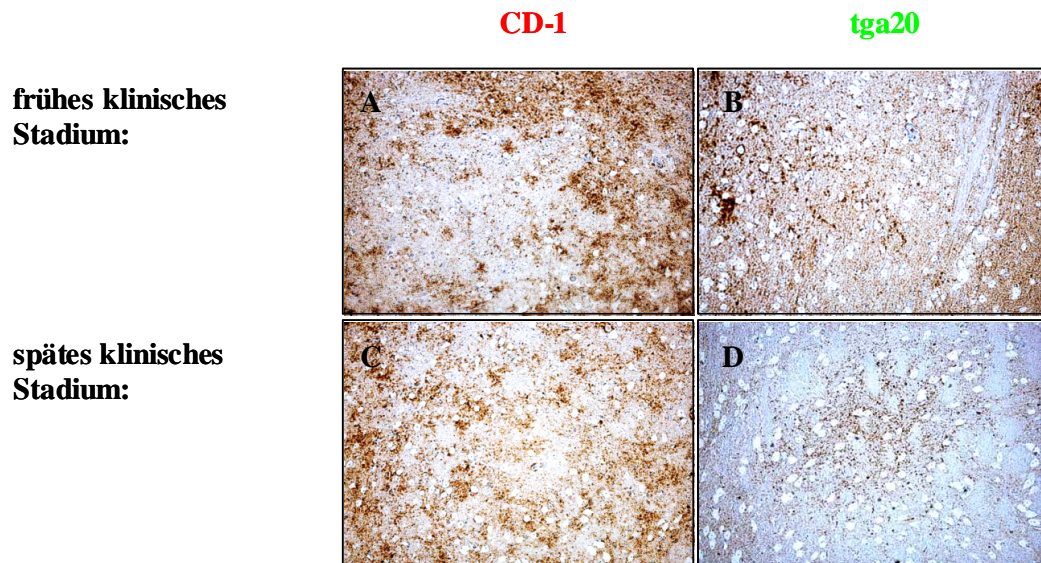


Abbildung 49: Immunhistochemischer Nachweis von PrPsc nach oraler Inokulation mit 1%igem Gehirn-homogenat in Gehirnen von klinisch kranken CD-1- und tga20-Mäusen (Bereich des Cerebrums/Diencephalons; Vergrößerung: 20x).

4.4.3.2 Western Blot

Präklinisch waren lediglich im Gehirn einer bereits in den vorangegangenen Untersuchungen auffälligen C57/Bl6-Maus (212 – Tier 2) PrPsc-spezifische Banden ohne NaPTA-Fällung nachweisbar. In allen anderen präklinisch untersuchten Tieren konnte PrPsc mittels Western Blot Analyse nicht nachgewiesen werden. Auch die zweite klinisch unauffällige, in der IHC positive C57/Bl6-Maus (166 – Tier – 3), war nach NaPTA-Fällung negativ für PrPsc (Ergebnis nicht gezeigt).

In den klinischen Krankheitsstadien waren die Ergebnisse der Western Blot Analyse ähnlich denen nach ip-Inokulation. Während in allen Proben klinisch kranker Wildtyp-Mäuse PrPsc bereits ohne NaPTA-Fällung nachweisbar war (Abb. 50 A), war für den Nachweis von PrPsc in den Gehirnproben kranker tga20-Mäuse in allen Fällen eine NaPTA-Fällung nötig und es stellten sich nur schwache PrPsc-spezifische Banden dar (Abb. 50 B). Interessanterweise konnten jedoch in den Proben von tga20-Mäusen, die mit 10%igem Gehirnhomogenat oral inokuliert worden waren, auch nach NaPTA-Fällung keine PrPsc-spezifischen Banden im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 50 B rechts). Nach immunhistochemischer Markierung waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufgefallen. PrPsc war sowohl in den Gehirnen von Tieren, die mit 1%igem als auch mit 10%igem Gehirnhomogen inokuliert worden waren, feststellbar.

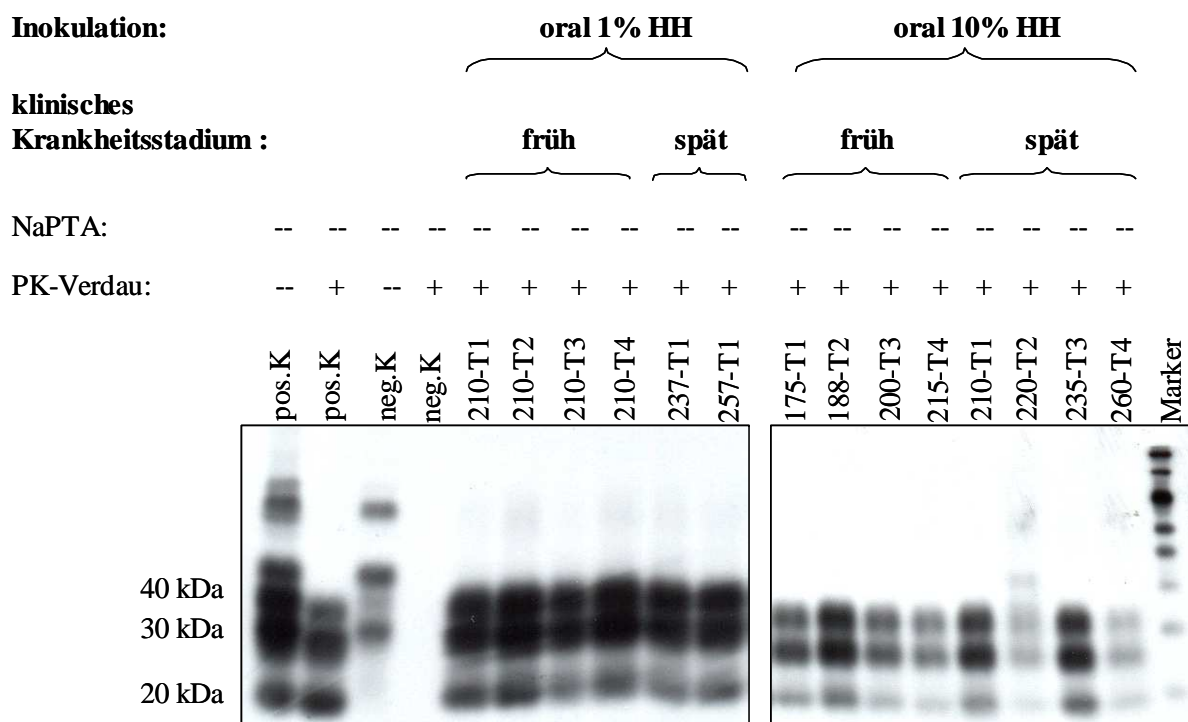
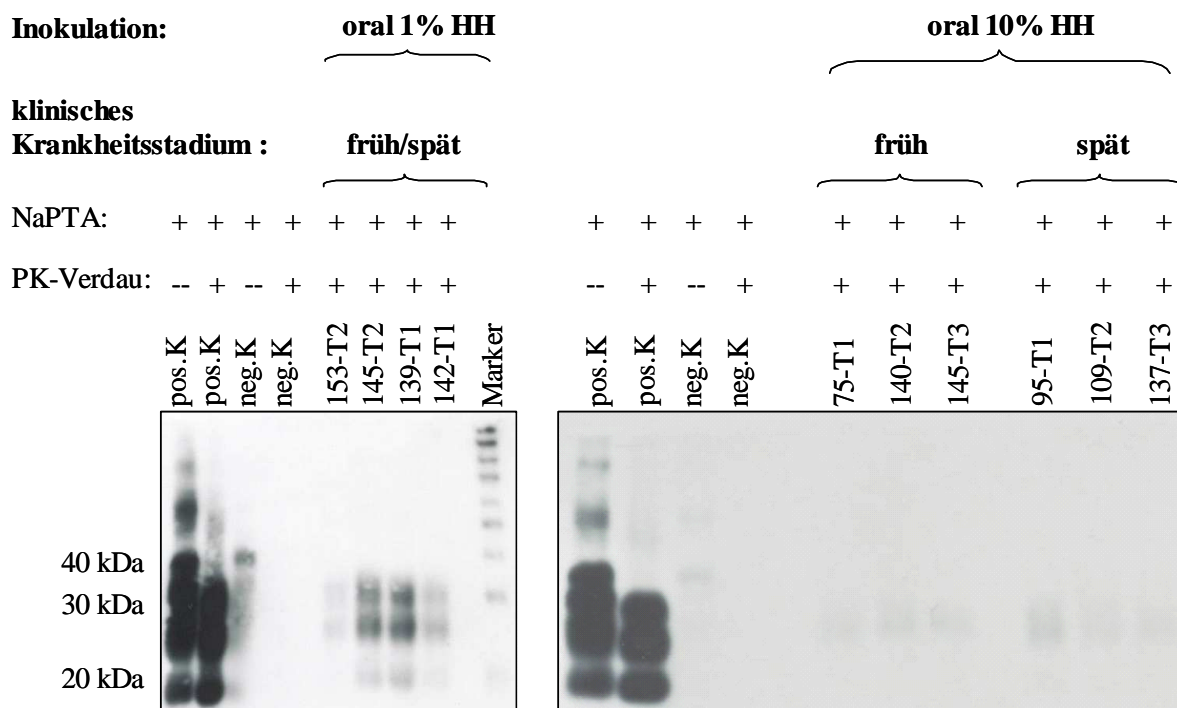
A**B**

Abbildung 50: Western Blot Analyse: Vergleich von Wildtyp- (A) und transgenen Mäusen (B) im frühen und späten Krankheitsstadium nach oraler Inokulation mit 1%- bzw. 10%igem Hirnhomogenat (HH). A: CD-1-Mäuse: Es zeigen sich ohne NaPTA-Fällung deutliche, für PrPsc spezifische Banden. B: tga20-Mäuse: Nach NaPTA-Fällung: mit 1%igem Gehirnhomogenat (links) sind PrPsc-spezifische Banden schwach nachweisbar; mit 10%igem Gehirnhomogenat (rechts) war PrPsc auch nach NaPTA-Fällung nicht nachweisbar. PK = Proteinase K; T = Tier; K = Kontrolle; kDa = Kilodalton.

4.4.4 Zusammenfassung

Bereits in den vorangegangenen Auswertungen zeigte sich, dass die hier untersuchten tga20-Mäuse über den gesamten Beobachtungszeitraum und bei gleich starker Ausprägung TSE-spezifischer Symptome sowohl eine geringere Vakuolisierung als auch eine geringere Induktion der GFAP-Genexpression bzw. Astrozytenaktivierung im Gehirn zeigten als die Tiere der beiden Wildtyp-Mausstämme. Dies geht einher mit einer ebenfalls geringeren Akkumulation von PrPsc. Nach allen drei Inokulationswegen war in den Gehirnen klinisch kranker tga20-Mäuse weniger PrPsc nachweisbar verglichen mit den beiden Wildtyp-Mausstämmen. Dies konnte mit beiden Nachweismethoden (Immunhistochemie und Western Blot Analyse) gezeigt werden. Besonders deutlich zeigte sich der Unterschied nach den beiden peripheren Inokulationswegen. Hier waren in den Gehirnen der tga20-Mäuse auch nach NaPTA-Fällung die für PrPsc typischen Banden nur schwach oder nicht nachweisbar, während sich in den Proben beider Wildtyp-Stämme auch ohne NaPTA-Fällung PrPsc-typische Banden darstellten. Dies geht einher mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Auswertung. Hier war nach ip- und oraler Inokulation in den Regionen des Cerebrums/Diencephalons nur eine geringgradige PrPsc-Akkumulation zu sehen und somit der Unterschied zwischen tga20- und Wildtyp-Mäusen am deutlichsten.

Ein weiterer Unterschied zwischen den transgenen und den Wildtyp-Mäusen bestand darin, dass bei hochgradig kranken tga20-Mäusen (spätes klinisches Krankheitsstadium) nach ic-Inokulation im Kleinhirn und nach ip- und oraler Inokulation im Kleinhirn sowie in den Regionen des Cerebrums/Diencephalons teilweise PrPsc ohne die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen nachweisbar war, wohingegen in den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen ab dem dritten präklinischen Zeitwert bis hin zum späten klinischen Krankheitsstadium die PrPsc-Akkumulation immer mit einer deutlichen Vakuolisierung einher ging.

Präklinisch zeigten sich in den tga20-Gehirnen PrPsc-Ablagerungen nach ic-Inokulation nicht und nach ip-Inokulation nur bei einem Tier, während in den Gehirnen beider Wildtyp-Mausstämme regelmäßig PrPsc in den Gehirnen klinisch unauffälliger Tiere nachweisbar war. Nach oraler Inokulation konnte PrPsc präklinisch nur bei zwei der zwölf klinisch unauffälligen C57/Bl6-Mäuse festgestellt werden. In diesen frühen präklinischen Stadien trat PrPsc in einigen Fällen auf bevor TSE-spezifischer Vakuolen nachweisbar waren.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der klinische Verlauf von Scrapie in Zusammenhang mit dem Auftreten von TSE-spezifischen Vakuolen sowie einer Astrozytose und der Akkumulation von pathologischem Prion-Protein (PrPsc) im Mausmodell untersucht. Zwei Wildtyp-Mausstämme (CD-1 und C57/Bl6) wurden mit dem transgenen tga20-Mausstamm, der gegenüber Wildtyp-Mäusen das zelluläre Prion-Protein (PrPc) im Gehirn um das ca. Zehnfache überexprimiert (Fischer *et al.* 1996), verglichen. Die Inokulation der Tiere erfolgte intrazerebral (ic), intraperitoneal (ip) und oral mit Prionen des maus-adaptierten Rocky Mountain Laboratory (RML)-Stammes in der sechsten Passage (RML-6). Die Gehirne der Tiere wurden zu verschiedenen präklinischen Zeitpunkten sowie mit einsetzenden TSE-typischen Symptomen und im späten Krankheitsstadium untersucht.

5.1 Klinischer Verlauf

5.1.1 Inkubationszeiten

Definierte Inkubationszeiten sind charakteristische Merkmale für verschiedene Prionen-Stämme in bestimmten Mauslinien. Es ist bekannt, dass die Inkubationszeiten von tga20-Mäusen sowohl nach ic-Inokulation als auch nach ip- und oraler Inokulation mit dem maus-adaptierten RML-Prionenstamm aufgrund ihrer Überexpression von PrPc im Gehirn wesentlich kürzer sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2002, Thackray *et al.* 2003). Dies bestätigte sich in der hier durchgeführten Studie. Nach ic-Inokulation erkrankten die tga20-Mäuse mit einer Inkubationszeit von 60 ± 4 dpi deutlich schneller als die Tiere der beiden Wildtyp-Mausstämme, die erst nach 144 ± 5 dpi (CD-1-Mäuse) bzw. nach 155 ± 6 dpi (C57/Bl6-Mäuse) deutlich ausgeprägte Symptome für Scrapie aufwiesen. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen der oben genannten Autoren, bei denen die Inkubationszeiten für ic-inokulierte tga20-Mäuse durchschnittlich zwischen 59 und 62 dpi und für Wildtyp-Mäuse durchschnittlich zwischen 134 dpi (CD-1) und 144 bzw. 145 dpi (C57/Bl6) lagen (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2002).

Nach ip-Inokulation erreichten die tga20-Mäuse nach 81 ± 3 dpi und die Wildtyp-Mäuse nach 199 ± 25 (CD-1) bzw. 205 ± 10 dpi (C57/Bl6) das späte Krankheitsstadium. Auch Thackray und Mitarbeiter wiesen verkürzte Inkubationszeiten bei ip-inokulierten tga20-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen nach (Thackray *et al.* 2003). Die Zeit bis zum späten Krankheitsstadium war bei tga20-Mäusen in der oben genannten Publikation etwas verlängert

gegenüber den eigenen Ergebnissen (130 ± 19 dpi im ersten Versuchsansatz und 113 ± 3 dpi im zweiten Versuchsansatz), während die Zeitwerte für Wildtyp-Mäuse mit den vorliegenden Daten korrelierten (225 ± 0 bzw. 204 ± 10 dpi). Innerhalb eines Prionen-Stammes können Inkubationszeiten geringfügig abweichen, wenn unterschiedliche Passagen in einer Mauslinie verwendet werden und sich somit abweichende Infektiositätstiter ergeben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere mit $1,48 \times 10^6$ LD₅₀ des RML-6 inokuliert, während in der Arbeit von Thackray et al. ein Inokulum von RML-5-Prionen mit einem Titer von $1,32 \times 10^5$ LD₅₀ verwendet wurde.

Während nach ic- und ip-Inokulation alle inokulierten Tiere Scrapie-spezifische Symptome entwickelten, erkrankten nach oraler Infektion mit dem 1%igen Homogenat nur einzelne Mäuse jedes Stammes. Der überwiegende Teil der Tiere blieb klinisch unauffällig. Bei den wenigen erkrankten Tieren zeigte sich aber, dass auch nach oraler Gabe vom RML-Prionen die tga20-Mäuse ca. 100 Tage früher als die Wildtyp-Mäuse Symptome entwickelten. Dies bestätigt die Ergebnisse von Thackray et al., die fanden, dass alle tga20-Mäuse, die oral inokuliert wurden, erkrankten, während alle Wildtyp-Mäuse (129Sv x C57/Bl6) über den gesamten Beobachtungszeitraum (> 600 dpi) klinisch unauffällig blieben (Thackray *et al.* 2003). Abweichend zu den eigenen Ergebnissen erkrankten allerdings in der genannten Studie alle tga20-Mäuse und keine der Wildtyp-Mäuse, während in den vorliegenden Untersuchungen jeweils einzelne Tiere aller drei Mausstämme Scrapie-spezifische Symptome aufwiesen und der überwiegende Teil der Tiere klinisch unauffällig blieb. Dies kann ebenfalls auf die Verwendung einer früheren Passage von RML-Prionen sowie eines anderen Wildtyp-Mausstammes zurückgeführt werden, was möglicherweise für eine bessere Adaptierung spricht.

Tga20- und CD-1-Mäusen wurde in einem weiteren Experiment eine 10%ige RML-Suspension, also eine zehnfach höhere Dosis, oral verabreicht. Danach zeigten alle Tiere beider Mausstämme das für Scrapie typische Krankheitsbild und waren somit für die Beurteilung der klinischen Symptome aussagekräftiger. Die tga20-Mäuse erreichten nach 114 ± 23 dpi und die CD-1-Mäuse nach 231 ± 29 dpi das späte klinische Krankheitsstadium. Auch hier wurde deutlich, dass nach oraler Verabreichung von RML-Prionen die Inkubationszeiten der tga20-Mäuse kürzer waren als die der Wildtyp-Mäuse. Für die orale Inokulationsroute war zudem eine deutlich höhere Dosis nötig, um das typische Krankheitsbild zu erzeugen. Bereits Kimberlin und Walker beschrieben den oralen Weg als die am wenigsten effektive Inokulationsroute verglichen mit ic- und ip-Inokulation (Kimberlin and Walker 1988). Im Gegensatz zu ic- und ip-Inokulationen, bei denen die Magen-Darm-Passage umgangen wird, entspricht die orale Infektion der natürlichen Inokulationsroute. Die längeren Inkubationszeiten nach

oralen Gabe stehen den natürlichen Infektionen wie z.B. Scrapie beim Schaf, BSE oder CJD wesentlich näher, während ic- und ip-Inokulationen ausschließlich experimentell genutzt werden und natürlicherweise nicht vorkommen. Nach oraler Aufnahme von Prionen ist noch immer nicht abschließend geklärt, wie der Erreger vom Darm in das Gehirn gelangt. Prionen werden von M-Zellen (sog. „microfold cells“), die sich im Schleimhautepithel über den Lymphfollikeln befinden, aufgenommen. Sie transportieren die Prionen über Transcytose auf die basolaterale Seite und somit in die Peyer'schen Platten und Nervenendigungen des Darms (Heppner *et al.* 2001). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass an der Weiterverbreitung von Prionen in andere lymphatische Gewebe und in das periphere Nervensystem auch Makrophagen beteiligt sind (Takakura *et al.* 2011). Über das sympathische und parasympathische Nervengeflecht breiten sie sich bei einigen Formen bis in Milz und Tonsillen aus (z.B. Scrapie beim Schaf, vCJD). Lymphgewebe scheint für die Replikation von Prionen eine wichtige Rolle zu spielen. Im Mausmodell sind nach oraler Infektion die Peyer'schen Platten nötig, damit sich eine Prionen-Erkrankung ausbilden kann (Prinz *et al.* 2003). Weiterhin sind die Anwesenheit funktionaler Follikulärer Dendritischer Zellen (FDCs) sowie B-Lymphozyten im Lymphgewebe unerlässlich (Montrasio *et al.* 2000; Klein *et al.* 1997). Ins ZNS gelangen Prionen schließlich über sympathische Fasern in das Rückenmark bzw. über den Nervus vagus und somit über parasympathische Innervation direkt ins Gehirn (Hoffmann *et al.* 2007).

5.1.2 Symptome

Neben den Inkubationszeiten wurde auch das klinische Bild der einzelnen Tiere mit einsetzenden TSE-spezifischen Symptomen und im späten Krankheitsstadium dokumentiert. Für RML-6-Prionen wurden hier erstmals in einer Studie die im Krankheitsverlauf auftretenden Symptome bei CD-1-, C57/Bl6- und tga20-Mäusen nach drei verschiedenen Inokulationswegen verglichen.

Nach ic-Inokulation zeigte sich bei CD-1- und tga20-Mäusen eine vergleichbare Symptomatik. Wichtigste Symptome waren eine fortschreitende Ataxie, Abmagerung und Lethargie, ein stumpfes und struppiges Fell sowie die Ausbildung einer Kyphose. Dabei handelt es sich um typische, Scrapie-spezifische Symptome, die bereits mehrfach beschrieben wurden (Chandler 1961, Dickinson *et al.* 1968, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2002). Bei der Kyphose handelt es sich um eine nach dorsal konvexe Aufkrümmung der Wirbelsäule. Sie entsteht, wenn das Zusammenspiel zwischen Knochen, Muskeln und Bändern gestört ist und kann daher vielfältige Ursachen haben. Eine mögliche Ursache bei Scrapie könnte eine

Dysfunktion in der synaptischen Übertragung und somit der Muskelkontraktion sein. Mulcahy *et al.* beschreiben den Nachweis von PrPsc an der neuromuskulären Endplatte und vermuten die Ausbreitung von Prionen vom Axon in die Skelettmuskulatur (Mulcahy *et al.* 2004). In der Studie von Thackray und Mitarbeitern wurde für die ic-Inokulation von RML-Prionen starker Juckreiz bei tga20-Mäusen in 40% der Fälle beschrieben (Thackray *et al.* 2002). Dies trat in den hier durchgeführten Versuchen nicht auf.

Die C57/Bl6-Mäuse wiesen in der vorliegenden Studie zusätzlich zu den beschriebenen Symptomen ein für sie charakteristisches nervöses Symptom auf: In unregelmäßigen Abständen auftretende Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens sowie eine Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße. Derartige Kontraktionen der Hautmuskulatur wurden im Mausmodell bisher nicht beschrieben. Abzugrenzen ist dies von dem bei mit Scrapie infizierten Schafen auftretenden Zittern, da die Kontraktionen weniger frequent auftraten und nicht in ein Zittern übergingen. Eine Parese der Hintergliedmaßen ist bei Mäusen bereits beschrieben worden (Westaway *et al.* 1994; Langevin *et al.* 2011).

Während beide Wildtyp-Mausstämme nach allen drei Inokulationsrouten die ähnlichen klinischen Symptome zeigten, unterschied sich das klinische Bild peripher inokulierter tga20-Mäuse wesentlich von den Symptomen, die ic-inokulierte tga20-Mäuse aufwiesen. So zeigten sie nach intraperitonealer und oralen Inokulation eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose. In der Studie von Thackray und Mitarbeitern, die ebenfalls tga20-Mäuse nach ip- und oraler Infektion mit RML-Prionen untersuchten, wurde eine solche Veränderung der Symptomatik gegenüber ic-Inokulationen nicht beschrieben (Thackray *et al.* 2002 und 2003). In den hier durchgeführten Untersuchungen war dies bei den tga20-Mäusen eindeutig der Fall. Intrazerebral inokulierte tga20-Mäuse waren ausnahmslos anhand des klinischen Bildes von den peripher inokulierten tga20-Mäusen unterscheidbar. Bolea und Mitarbeiter inokulierten tga20-Mäuse intraperitoneal mit C506M3 Scrapie-Prionen und beschrieben Bewegungsstörungen, Gewichtsverlust und Entkräftung als klinische Symptome (Bolea *et al.* 2010). Allerdings lag der Fokus der Studie nicht auf der Beschreibung klinischer Symptome und es fand kein Vergleich zu ic-inokulierten Tieren statt.

Dass nach Inokulation eines Mausstammes mit einem bestimmten Prionen-Stamm zwei verschiedene klinische Bilder nach unterschiedlichen Inokulationswegen auftreten, dass also das klinische Bild abhängig vom Inokulationsweg ist, ist bisher nur bei den transgenen tg338-Mäusen, die das V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ Allel des ovinen PrP um das Achtfache überexprimieren, beschrieben worden (Langevin *et al.* 2011). In dieser Studie wurden tg338-Mäuse

intrazerebral und intraperitoneal mit 127S Scrapie-Prionen infiziert. Die Tiere zeigten nach ic-Inokulation Übererregbarkeit, Hyperästhesie, schwankenden Gang und einen aufgerollten Schwanz, während ip-inokulierte Mäuse Lethargie, Dekubitus sowie eine Parese der Hintergliedmaßen aufwiesen.

Es wurde postuliert, dass der Verlauf bzw. die klinische Ausprägung von Scrapie abhängig von der Infektionsausbreitung und Replikation in bestimmten klinischen Zielregionen des Gehirns („clinical target areas“) ist (Kimberlin *et al.* 1983, Kimberlin und Walker 1986). Die Autoren erklärten sich damit die unterschiedlich langen Inkubationszeiten nach verschiedenen Inokulationsrouten. Dass dabei verschiedene Symptome auftreten, die abhängig vom Inokulationsweg sind, wurde nicht beschrieben. Karapetyan *et al.* (2009) fanden, in Korrelation mit den hier dargestellten Ergebnissen, die stärksten PrPsc-Akkumulationen bei ic-inokulierten tga20-Mäusen im Bereich des Hirnstammes und des Thalamus und vermuteten, dass diese beiden Gehirnbereiche die klinischen Zielregionen dieser Mäuse darstellen (Karapetyan *et al.* 2009). Es wäre denkbar, dass bei den tga20-Mäusen nach ic-Inokulation andere klinische Zielregionen des Gehirns betroffen sind als nach ip- und oraler Inokulation. Tatsächlich ergaben die hier durchgeführten Untersuchungen nach ip- und oraler Inokulation eine deutlich geringere PrPsc-Ablagerung im Bereich des Cerebrums und Dienzephalons mit Cortex, Hippocampus, Corpus striatum, Thalamus und Hypothalamus (siehe Abb. 7) verglichen mit den ic-inokulierten tga20-Mäusen. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Langevin *et al.* in tg338-Mäusen. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die Infektionsroute die Verteilung von PrPsc bestimmt. Nach ip-Inokulation war die PrPsc-Ablagerungen beschränkt auf den Hirnstamm und den Hypothalamus, während nach ic-Inokulation zahlreiche PrPsc-Ablagerungen über mehrere Gehirnregionen, wie z.B. Hirnstamm, Mesencephalon, Hippocampus und Septum verbreitet waren (Langevin *et al.* 2011). Die Autoren weisen darauf hin, dass durch die Platzierung der Injektionsnadel bei ic-Inokulationen Prionen in Gehirnregionen gelangen, die nicht zu den bestimmten klinischen Zielregionen zählen und somit ein abweichendes klinisches Bild erzeugt wird. Dies erklärt allerdings nicht, warum Wildtyp-Mäuse ein einheitliches klinisches Bild unabhängig vom Inokulationsweg zeigten. Sie wiesen nach allen drei Inokulationsrouten die gleichen klinischen Symptome auf und es ergaben sich auch keine Unterschiede im Nachweis von PrPsc bezüglich der verschiedenen Lokalisationen.

Ein weiterer Faktor, der das Läsionsprofil und somit auch den klinischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen könnte, ist das Glykosylierungsprofil des zellulären Prion-Proteins (PrPc). PrPc ist ein Glykoprotein, das nicht-, mono- bzw. di-glykosyliert vorliegen kann. Es ist bekannt, dass die Glykosylierung von PrPc die zelluläre Lokalisation des Proteins beein-

flusst (Cancellotti *et al.* 2007) und dass das PrPc-Glykosylierungsmuster im Gehirn von gesunden Wildtyp-Mäusen je nach Gehirnregion verschieden ist (Beringue *et al.* 2003, DeArmond *et al.* 1999). Die Glykosylierung von PrPc spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Lokalisation der PrPsc-Ablagerung im Gehirn und somit für die resultierende Neuropathologie und das klinische Bild (Cancellotti *et al.* 2007, DeArmond *et al.* 1997, Levavasseur *et al.* 2008, Tuzi *et al.* 2008).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen tga20- und Wildtyp-Mäusen, der Einfluß auf die Ausbildung der klinischen Symptome haben könnte, ist die inhomogene Überexpression von PrPc im Gehirn der tga20-Mäuse. Karapetyan *et al.* konnten zeigen, dass die Überexpression von PrPc im Gehirn von tga20-Mäusen nicht homogen ist im Gegensatz zu der PrPc-Expression in C57/Bl6-Maus-Gehirnen (Karapetyan *et al.* 2009). Im Hirnstamm findet sich bei tga20-Mäusen beispielsweise eine um das 21fache erhöhte Expression, während im Cortex nur eine 5,5fache Erhöhung verglichen zu C57/Bl6-Mäusen auftritt. Dies würde auch zu den eigenen Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises von PrPsc passen, denn nach ip- und oraler Inokulation akkumulierten tga20-Mäuse im Bereich des Cortex deutlich weniger PrPsc als die Wildtyp-Mäuse und ic-inokulierte tga20-Mäuse.

5.2 Vakuolisierung

Die Ausbildung von Vakuolen im Gehirn ist Teil der Neuropathologie von Prionen-Erkrankungen. Ihr Verteilungsmuster ist je nach Prionen-Stamm und Tierart charakteristisch und ergibt ein definiertes Läsionsprofil. Es werden zwei morphologische Wege bei der Entstehung von Vakuolen vermutet. Zum einen eine Schwellung von Dendriten und Axonen und Verlust intrazellulärer Organellen; zum anderen eine Dilatation membrangebundener Organellen innerhalb der Neuriten und des Perikaryons (Baker *et al.* 1990, Ersdal *et al.* 2004, Jeffrey *et al.* 1992, Jeffrey *et al.* 2011). Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass die Expression von Genen des Zytoskeletts nach einer Prioneninfektion verändert ist (Skinner *et al.* 2006). Dazu gehören beispielsweise der „actin related protein 2/3-Komplex“, Neurofilament 3, Peripherin I und Vimentin. Die Autoren vermuten eine Rolle dieser veränderten Genexpressionen bei der Entstehung von Vakuolen in Neuronen. Zudem reichert sich PrPsc in Lysosomen an (McKinley *et al.* 1991). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass auch Zahl und Größe der Lysosomen erhöht sind (Jeffrey *et al.* 2009). Möglicherweise schädigt PrPsc diese Zellorganellen, die sowohl zellfremdes als auch zelleigenes Material abbauen können, und es werden Verdauungsenzyme freigesetzt, die zu Vakuolenbildung führen. Diskutiert werden außerdem

neurotoxische Faktoren in Verbindung mit der auftretenden Astrozytose und eine mögliche direkte Neurotoxizität des PrPsc (Chiesa and Harris 2001; Forloni *et al.* 1993).

Die Beurteilung der Vakuolisierung erfolgte in dieser Arbeit am histologischen Schnitt nach HE-Färbung. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausbildung klinischer Symptome nicht mit der Stärke der spongiformen Läsionen korreliert. Obwohl die hier untersuchten transgenen Mäuse das zelluläre Prion-Protein, das essentiell ist für die Ausbildung der Krankheit (Bueler *et al.* 1993), stark überexprimieren und schneller krank werden als die Wildtyp-Mäuse, war die Vakuolisierung ihres Gehirns deutlich schwächer. Bei gleich starker Manifestation klinischer Symptome zeigte sich eine geringere Ausbildung spongiformer Läsionen. Die Ausbildung später Krankheitssymptome war in den beschriebenen Versuchen somit unabhängig vom Grad der Vakuolisierung.

Bei den CD-1- und C57/Bl6-Mäusen waren nach allen drei Inokulationsrouten alle untersuchten Regionen des Gehirns betroffen, wobei sich die stärksten Läsionen im Bereich des Kleinhirns und des Hirnstammes darstellten. Die Anteile des Cerebrums und Dienzephalons (siehe Abb. 7) waren ebenfalls immer mitbetroffen, wenn auch etwas schwächer vakuolisiert. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den tga20-Mäusen nur im Bereich des Hirnstammes nach allen drei Inokulationsrouten spongiforme Veränderungen. Die Anteile des Cerebrums und Dienzephalons waren nur nach ic-Inokulation in allen Fällen verändert und nach den beiden peripheren Inokulationswegen wesentlich seltener und schwächer betroffen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Langevin und Mitarbeiter bei tg338-Mäusen, die mit 127S Scrapie-Prionen ic- und ip-inokuliert wurden (Langevin *et al.* 2011). Ip-inokulierte Tiere zeigten eine ähnlich starke Ausprägung klinischer Symptome, obwohl nach ip-Inokulation nur der Hirnstamm und Cortex betroffen waren, während sich die Vakuolisierung ic-inokulierter Tiere über mehrere Anteile des Gehirns erstreckte und stärker ausgeprägt war.

Dass die Ausprägung klinischer Symptome unabhängig vom Vakuolisierungsgrad ist, zeigte sich zusätzlich darin, dass in den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse bereits präklinisch, also bei klinisch unauffälligen Tieren, eine deutliche Vakuolisierung der Gehirnareale auftrat, die stärker war als bei tga20-Mäusen im späten Krankheitsstadium. In den Gehirnen der tga20-Mäuse waren präklinisch zu keinem Zeitpunkt TSE-spezifische Vakuolen in den Gehirnen nachweisbar.

Es konnte also erstmals gezeigt werden, dass tga20-Mäuse sowohl nach ic- als auch nach ip- und oraler Inokulation von RML-Prionen trotz vergleichbarer Ausprägung der Symptome deutlich weniger spongiforme Läsionen aufweisen als Wildtyp-Mäuse. Eine starke Vakuoli-

sierung scheint somit weder notwendig noch ausreichend zu sein für die Ausbildung von klinischen Symptomen bis hin zum späten Krankheitsstadium.

Auch bei zwei anderen Tierspezies sind abweichend vom klassischen histopathologischen Bild keine Vakuolen im Gehirn nachweisbar. Bei klinisch kranken Nerzen vom Chediak-Higashi-Genotyp (Marsh *et al.* 1976) und in Schafen, die experimentell mit SSBP/1-Scrapie-Prionen infiziert wurden (Begara-McGorum *et al.* 2002) fand keine Vakuolisierung statt (Jeffrey *et al.* 2011).

5.3 Astrozytose

Astrozyten sind die größten Gliazellen des ZNS und werden daher auch als Makroglia bezeichnet. Sie bilden zytoplasmatische Fortsätze aus, die mit Nervenzellen und perivaskulär mit Blutkapillaren in Verbindung stehen. Astrozyten reagieren auf die verschiedensten Hirnläsionen mit Hypertrophie und Proliferation, einer Astrozytose. Sie besitzen ein hohes antioxidatives Potential und schützen Neuronen vor oxidativem Stress. Eine reaktive Astrozytose ist daher eine unspezifische Abwehrreaktion der Gliazellen auf verschiedene z.B. traumatische oder ischämische Veränderungen. Sie kommt neben Prionenerkrankungen auch bei Morbus Alzheimer vor und kann geringgradig auch bei Morbus Parkinson auftreten.

Das Intermediärfilament Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) dient als spezifischer Marker für Astrozyten, wobei dessen Funktion in Astrozyten weitestgehend ungeklärt ist. Es scheint jedoch für die Ausbildung von stabilen astrozytären Fortsätzen zu Neuronen essentiell zu sein (Weinstein *et al.* 1991). Prionen-Erkrankungen führen in ihrem Verlauf zu einer reaktiven Astrozytose mit erhöhter GFAP-Expression (Bueler *et al.* 1993, Lazarini *et al.* 1994, Manuelidis *et al.* 1987, Wietgreffe *et al.* 1985). Dabei werden verschiedene Cytokine wie Interferone (IFN_{α} , IFN_{β} , IFN_{γ}) und Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) sowie Tumornekrosefaktoren (TNF_{α} , TNF_{β}) und Prostaglandin E2 (Williams *et al.* 1997) freigesetzt. Außerdem aktivieren aktivierte Astrozyten Mikrogliazellen, die ebenfalls Cytokine wie Interleukin-1 β und Interleukin-6 ausschütten (Peyrin *et al.* 1999).

In der vorliegenden Studie erfolgte der Proteinnachweis des GFAP mittels Immunhistochemie (IHC) am histologischen Schnitt. Die GFAP-Genexpression wurde semi-quantitativ mittels RT-PCR und Northern Blot Analyse untersucht. Im Gegensatz zu dem Vorkommen TSE-spezifischer Vakuolen und dem Nachweis von PrPsc wurde die Astrozytenzahl nach immunhistochemischer Markierung nicht in den einzelnen Gehirnregionen (Abb. 7), sondern

im Gehirn insgesamt beurteilt. Auch für die Untersuchungen zur GFAP-Genexpression wurde die RNA aus einer Gehirnhälfte, nicht aber aus definierten Gehirnarealen untersucht.

Die Resultate zeigen, dass das Ausmaß der Astrozytenaktivierung nicht mit der Ausprägung klinischer Symptome korreliert. Die Astrozytenaktivierung war, ebenso wie die Vakuolisierung, in den Gehirnen der tga20-Mäuse nach allen drei Inokulationswegen in vergleichbaren Krankheitsstadien deutlich schwächer ausgebildet als bei den Tieren der beiden Wildtyp-Mausstämme. Ähnlich wie TSE-spezifische Vakuolen konnte auch eine Astrozytose bereits bei klinisch unauffälligen Tieren festgestellt werden. Dies war ebenfalls nur bei den Wildtyp-Mäusen regelmäßig und in starker Ausprägung der Fall, während bei klinisch unauffälligen tga20-Mäusen nur nach ic-Inokulation sehr vereinzelt geringgradig erhöhte Astrozytenzahlen auftraten.

Nach den beiden peripheren Inokulationsrouten waren die Unterschiede zwischen den transgenen und den Wildtyp-Mäusen deutlicher als nach intrazerebraler Inokulation. In der immunhistochemischen Auswertung zeigte sich beispielsweise sowohl nach intraperitonealer als auch nach oraler Gabe von RML kein signifikanter Anstieg der Astrozytenzahl bei den tga20-Mäusen, während die Astrozytose bei den Tieren der beiden Wildtyp-Mausstämme ähnlich stark ausgebildet war wie nach intrazerebraler Inokulation. Bisher gibt es keine entsprechenden Studien zu diesen peripheren Inokulationswegen bei tga20-Mäusen. Vergleichbare Ergebnisse finden sich für tg338-Mäuse. Langevin und Mitarbeiter konnten ebenfalls im Gegensatz zur ic-Inokulation keinen Anstieg der GFAP-Expression bei ip-inokulierten Mäusen nachweisen (Langevin *et al.* 2011). In einer Studie, in der C57/Bl6- und tga20-Mäuse intrazerebral mit RML inokuliert wurden, wurden im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen keine Unterschiede bezüglich der Stärke der Vakuolisierung und der Astrozytose, die mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde, beschrieben (Thackray *et al.* 2002). Beide Parameter wurden allerdings nicht quantifiziert, so dass Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen möglicherweise nicht deutlich wurden.

Eine grundsätzlich geringere Anzahl an Astrozyten bzw. eine niedrigere GFAP-Genexpression in den Gehirnen gesunder, unbehandelter tga20-Mäuse konnte nach Vergleich der ausgewerteten Gehirne von nicht-inokulierten Kontrolltieren der drei Mausstämme ausgeschlossen werden.

Verschiedene andere Studien zeigten ebenfalls, dass GFAP für die Pathogenese der Erkrankung nicht essentiell ist. GFAP-knockout-Mäuse sind ebenso empfänglich für Scrapie wie Wildtyp-Mäuse. Nach intrazerebraler Inokulation von *Gfap*^{-/-}-Mäusen mit Scrapie-

Prionen wiesen diese eine typische Scrapie-spezifische Neuropathologie und ähnliche Inkubationszeiten auf wie inokulierte Wildtyp-Mäuse (Gomi *et al.* 1995, Tatzelt *et al.* 1996). Dennoch gibt es zahlreiche Hinweise, dass GFAP durchaus eine Rolle in der Pathogenese von Prionen-Erkrankungen spielen kann. Biochemische Studien zeigten eine spezifische Bindung zwischen PrPsc und GFAP (Oesch *et al.* 1990). Dong *et al.* konnten Komplexe zwischen PrPc und GFAP und somit ebenfalls eine Interaktion zwischen beiden Proteinen nachweisen (Dong *et al.* 2008). Inwieweit eine solche Proteininteraktion für die Pathogenese von Prionen-Erkrankungen wichtig ist, ist ungeklärt.

Die in dieser Studie angewendeten verschiedenen Methoden zum Nachweis einer Astrozytose (Immunhistochemie, RT-PCR, Northern Blot Analyse) lieferten bei hochgradigen Veränderungen übereinstimmende Ergebnisse. Bei geringgradiger Erhöhung der Astrozytenzahl bzw. der GFAP-Genexpression, wie z.B. in frühen präklinischen Krankheitsstadien oder auch bei den tga20-Mäusen, waren die Resultate in einzelnen Fällen nicht vollständig übereinstimmend. Auch Manuelidis *et al.* beschrieben eine temporäre Diskrepanz bei dem Nachweis einer Astrozytose mit verschiedenen Methoden. Es zeigten sich dabei uneinheitliche Ergebnisse in der GFAP-Genexpression und der GFAP-Immunoreaktivität im präklinischen Stadium bei Hamstern, die mit in Nagern mehrfach passagierten humanen CJD-Prionen intrazerebral inokuliert waren (Manuelidis *et al.* 1987). Die Autoren führen diese temporäre Diskrepanz auf eine unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Methoden zurück. Wie auch in den beschriebenen Untersuchungen, waren die Ergebnisse der beiden Methoden mit zunehmender Stärke der Astrozytose einheitlich. Dies zeigt, dass bei geringgradigen Veränderungen der GFAP-Genexpression die eingesetzte Nachweismethode die Interpretation der Ergebnisse nicht unerheblich beeinflussen kann. Daher ist es sinnvoll, verschiedene Nachweismethoden innerhalb einer Studie einzusetzen, um letztendlich klare Tendenzen ableiten zu können.

5.4 PrPsc

Neben der spongiformen Degeneration und einer astrozytären Gliose findet bei TSE-Erkrankungen außerdem eine Akkumulation des pathologischen Prion-Proteins (PrPsc) im ZNS statt, dessen Verteilung charakteristisch für einen bestimmten Prionen-Stamm ist. Daher wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu Vakuolisierung und Astrozytose die PrPsc-Ablagerungen in den Gehirnen der Mäuse untersucht. Der Nachweis von PrPsc erfolgte mittels Immunhistochemie und Western Blot Analyse.

Ähnlich der Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen und der Aktivierung von Astrozyten korreliert die Ablagerung von pathologischem Prion-Protein nicht mit der Stärke der neuro-

pathologischen Symptome. Nach allen drei Inokulationsrouten, besonders deutlich aber nach ip- und oraler Inokulation, zeigten wiederum die tga20-Mäuse weniger PrPsc im Gehirn als die Tiere der beiden Wildtyp-Mausstämme bei gleich starker Ausbildung der Krankheits-symptome. Dies zeigte sich nach immunhistochemischer Markierung besonders deutlich im Bereich des Cerebrums und Dienzephalons und spiegelte sich auch in der Western Blot Analyse wider. Während in allen Proben klinisch kranker Tiere beider Wildtyp-Mausstämme PrPsc bereits ohne NaPTA-Fällung nachweisbar war, war für alle Proben von tga20-Gehirnen eine NaPTA-Fällung nötig und auch danach waren teilweise keine PrPsc-spezifischen Banden bei klinisch kranken Tieren nachzuweisen.

Zwei weitere Studien hatten nach ic-Inokulation von RML-Prionen ebenfalls weniger PrPsc in den Gehirnen terminal kranker tga20-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach Western Blot Analyse bzw. nach immunhistochemischer Markierung festgestellt (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009). Auch nach ic-Inokulation mit anderen Prionen-Stämmen, wie z.B. ME7 und 22L, akkumulieren tga20-Mäuse weniger PrPsc im Gehirn als Wildtyp-Mäuse (Karapetyan *et al.* 2009). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das in den Gehirnen von tga20-Mäusen überexprimierte PrPc nicht bzw. nur unzureichend zu PrPsc konvertiert wird. Karapetyan und Mitarbeiter fanden heraus, dass das PrPc von nicht-infizierten tga20-Gehirnen resistenter gegenüber dem Verdau mit Proteinase K ist als das PrPc von Wildtyp-Mäusen (Karapetyan *et al.* 2009). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Überexpression von PrPc in tga20-Gehirnen in einem missgefalteten, aggregierten PrPc resultiert, das aber nicht in pathologisches PrPsc konvertiert werden kann. Diskutiert wird außerdem, dass die Akkumulation von PrPsc ein zeitabhängiger Prozess sein könnte und die Inkubationszeiten bei diesem Mausstamm einfach zu kurz sind, um ähnliche PrPsc-Mengen im Gehirn anzureichern wie bei Wildtyp-Mäusen (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009). Diese Hypothese muss nach den vorliegenden Ergebnissen auch für die Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen und einer reaktiven Gliose in Betracht gezogen werden.

Für die beiden peripheren Inokulationswege gibt es bisher keine vergleichbaren Studien für die tga20-Mäuse. Für die tg338-Mäuse wurden jedoch ähnliche Ergebnisse beschrieben. In den Gehirnen von kranken, ip-inokulierten Tieren wurde zehnmal weniger PrPsc nachgewiesen als in den Gehirnen von kranken, ic-inokulierten Tieren (Langevin *et al.* 2011).

Zudem war in der vorliegenden Arbeit in den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen häufig bereits präklinisch mehr PrPsc nachweisbar als in den Gehirnen klinisch kranker tga20-Mäuse. Das Auftreten von PrPsc im Gehirn ohne die Ausbildung neuropathologischer Symptome wurde

auch in anderen Modellen beschrieben. Nach Inokulation von aufgereinigtem PrPsc aus GSS-Patienten im Mausmodell trat eine massive PrPsc-Akkumulation ohne die Ausbildung klinischer Symptome auf (Piccardo *et al.* 2007). Untersuchungen nach oraler „low-dose“-Inokulation in tga20- und Wildtyp-Mäusen zeigten ebenfalls eine signifikante Akkumulation von PrPsc im Gehirn der Tiere, ohne dass klinische Symptome erkennbar waren (Thackray *et al.* 2003).

Da in den hier durchgeführten Untersuchungen eine deutliche Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen sowie eine Astrozytose und PrPsc-Akkumulation nachgewiesen werden konnte, ohne dass Scrapie-assoziierte klinische Symptome auftraten, müssen auch mögliche andere Faktoren in Betracht gezogen werden. Obwohl die Neurotoxizität von PrPsc selbst beschrieben wurde (Chiesa and Harris 2001; Forloni *et al.* 1993) und PrPsc noch immer als die infektiöse Ursache bei Prionen-Erkrankungen angesehen wird, wird das Vorhandensein weiterer Faktoren seit Jahren diskutiert. Bereits im Heterodimerisationsmodell wird die Beteiligung eines sogenannten „Protein X“ vermutet, das bisher jedoch nicht charakterisiert werden konnte. Da in der vorliegenden Studie einerseits die tga20-Mäuse bei gleich starker Ausbildung klinischer Symptome deutlich weniger Vakuolisierung, Astrozytose und PrPsc-Akkumulation aufwiesen verglichen zu Wildtyp-Mäusen und andererseits klinisch unauffällige Wildtyp-Mäuse vor dem Auftreten von Symptomen bereits mehr Veränderungen zeigten als kranke tga20-Mäuse, scheint die Existenz eines neurotoxischen Agens neben PrPsc sehr wahrscheinlich. Neben den genannten neuropathologischen Veränderungen kommt es bei der Infektion mit Prionen außerdem zu neuronalem Zelltod durch Apoptose (Forloni *et al.* 1993, Giese *et al.* 1995). Diese Vorgänge, die in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Manifestation klinischer Symptome. Lasmezas *et al.* (1997), die in Gehirnen von C57/Bl6-Mäusen trotz klinischer Symptome weder PrPsc noch Vakuolen oder eine Astrozytose nachweisen konnten, fanden degenerierte Zellen in der Purkinje-Zellschicht und in der CA1-Region des Hippocampus und konnten die elektronenmikroskopischen Charakteristika einer Typ I Apoptose zuordnen. Dementsprechend wird zunehmend vermutet, dass die klinische Erkrankung durch Verlust von Neuronen durch Apoptose entsteht (Jeffrey *et al.* 2011, Kovacs and Budka 2009). So konnte bei Schaf-Scrapie beispielsweise eine Erhöhung pro-apoptotischer Faktoren wie z.B. BAK (Serrano *et al.* 2009) im Gehirn nachgewiesen werden. Drew und Mitarbeiter wiesen eine Aktivierung von Caspasen sowohl im Gehirn als auch in peripheren Organen wie Niere, Lunge und Ileum im Mausmodell nach (Drew *et al.* 2011).

Insgesamt beruhen die bisherigen Erkenntnisse der molekularen Abläufe der Neurotoxizität bei Prionenerkrankungen noch immer stark auf Vermutungen (Aguzzi *et al.* 2007, Langevin *et al.* 2011, Mallucci and Collinge 2005). Unklar ist auch, warum in manchen subklinischen Verläufen viel PrPsc und starke Infektiosität nachgewiesen wird (Hill *et al.* 2000; Race *et al.* 2001), ohne dass sich klinisch Symptome manifestieren, während in anderen Fällen, wie auch in der vorliegenden Studie, bei hochgradig erkrankten Tieren wenig PrPsc nachgewiesen wird (Langevin *et al.* 2011).

Der Nachweis von PrPsc war nicht immer gekoppelt an die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen. Bei den Wildtyp-Mäusen war PrPsc präklinisch häufig nachweisbar noch bevor sich TSE-spezifische Vakuolen ausbildeten. Erst im weiteren klinischen Verlauf war der Nachweis von Vakuolen in den Gehirnen der Wildtyp-Mäuse immer gekoppelt an das Auftreten von PrPsc. Bei den tga20-Mäusen zeigte sich jedoch auch im späten Krankheitsstadium, beispielsweise im Kleinhirn, eine PrPsc-Akkumulation ohne die Bildung von Vakuolen.

Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien. Williams und Mitarbeiter (1997), die Mäuse mit dem BSE-Stamm 301V intrazerebral inokulierten, konnten ebenfalls bereits präklinisch PrPsc-Ablagerungen und erst im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Vakuolisierung nachweisen. In einer Untersuchung von terminal kranken C57/Bl6-Mäusen, die intrazerebral mit BSE inokuliert wurden, waren, wie auch in den eigenen Untersuchungen, spongiforme Läsionen direkt gekoppelt an den Nachweis von PrPsc (Lasmezas *et al.* 1997). Für tga20-Mäuse gibt es bisher keine vergleichbaren Studien.

In dieser Arbeit wurden erstmals die Zusammenhänge zwischen dem klinischen Verlauf von Scrapie und den neuropathologischen Veränderungen nach ic-, ip- und oraler Inokulation von RML-Prionen bei Tieren zweier Wildtyp-Mausstämme und tga20-Mäusen genauer charakterisiert. Zusammenfassend ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Die transgenen tga20-Mäuse wiesen sowohl nach intrazerebraler als auch nach intraperitonealer und oraler Inokulation kürzere Inkubationszeiten auf als die Wildtyp-Mäuse. Dies ist wahrscheinlich auf die Überexpression des zellulären Prion-Proteins im Gehirn dieser Tiere zurückzuführen und korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls verkürzte Inkubationszeiten bei tga20-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen fanden (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2002, Thackray *et al.* 2003).

2. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass sich nach Inokulation von tga20-Mäusen mit RML-Prionen unterschiedliche klinische Symptome ausbildeten, die abhängig von der Inokulationsroute waren.

3. Die tga20-Mäuse zeigten neben einer geringeren Vakuolisierung auch eine schwächere reaktive Gliose sowie weniger PrPsc im Gehirn als die Wildtyp-Mäuse bei gleich starker Ausprägung der klinischen Symptome. Es konnte also erstmals gezeigt werden, dass die beschriebene geringere Akkumulation von PrPsc in Gehirnen kranker tga20-Mäuse nach ic-Inokulation (Fischer *et al.* 1996, Karapetyan *et al.* 2009, Thackray *et al.* 2003,) sowie nach ip- und oraler Inokulation einher geht mit einer im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen geringeren Ausbildung von TSE-spezifischen Vakuolen und Astrozytose.
4. Die Ausbildung spongiformer Läsionen sowie eine Astrozytenaktivierung und auch die Akkumulation von PrPsc scheint demnach weder notwendig noch ausreichend zu sein für die Ausbildung von klinischen Symptomen bis hin zum späten Krankheitsstadium.
5. Der Nachweis von PrPsc war nicht immer gekoppelt an die Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen.

Die Pathogenese der charakteristischen neuropathologischen Veränderungen bei Prionenerkrankungen ist noch immer nicht geklärt und die hier dargestellten Ergebnisse lassen ebenfalls vermuten, dass sowohl im Hinblick auf die Neurotoxizität als auch für die Ausbildung klinischer Symptome neben PrPsc weitere Faktoren vorliegen, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Die Ausbildung verschiedener klinischer Krankheitsbilder in Abhängigkeit von der Inokulationsroute bei den tga20-Mäusen, die hier erstmals beschrieben wurde, erfordert ebenfalls weiterführende Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammenhänge zwischen dem Verlauf von Scrapie und der Ausbildung Scrapie-typischer Symptome sowie zwischen der Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen, einer Astrozytose und der Akkumulation von PrPsc im Mausmodell charakterisiert. Dazu wurden Mäuse zweier Wildtyp-Linien (CD-1 und C57/Bl6) und Tiere des transgenen tga20-Mausstammes mit einem 1%igen bzw. 10%igen Gehirnhomogenat des maus-adaptierten Prionen-Stammes Rocky Mountain Laboratory (RML) intrazerebral (ic) intraperitoneal (ip) und oral inokuliert. Tga20-Mäuse überexprimieren das zelluläre Prion-Protein um das ca. Zehnfache im Gehirn verglichen mit Wildtyp-Mäusen und weisen daher kürzere Inkubationszeiten auf. Es wurden der Verlauf der Erkrankung sowie die klinischen Symptome dokumentiert und die Gehirne der Tiere in sowohl präklinischen Krankheitsstadien als auch mit einsetzenden Symptomen und im späten Stadium der Erkrankung untersucht. Neben der ic-Inokulation wurden erstmals auch zwei periphere Inokulationswege detailliert für die tga20-Mäuse analysiert.

Die Beurteilung der Vakuolisierung erfolgte am histologischen Schnitt nach HE-Färbung. Die Ausbildung einer Astrozytose wurde anhand der Astrozytenzahl durch Immunhistochemie und anhand der GFAP-Genexpression durch RT-PCR und Northern Blot Analyse nachgewiesen. Die Akkumulation von PrPsc wurde am histologischen Schnitt der Gehirne nach Immunhistochemie und durch Western Blot Analyse ausgewertet.

Tga20-Mäuse wiesen nach allen drei Inokulationswegen verkürzte Inkubationszeiten auf verglichen mit den Wildtyp-Mäusen.

Bei der klinischen Beurteilung der Tiere fielen Unterschiede in der Symptomatik zwischen den drei Mausstämmen auf. Wichtigste Symptome der beiden Wildtyp-Mausstämme waren eine fortschreitende Ataxie, Abmagerung und Lethargie, die Ausbildung eines stumpfen und struppigen Felles sowie eine Kyphose. C57/Bl6-Mäuse wiesen außerdem in unregelmäßigen Abständen auftretende Zuckungen der Hautmuskulatur im Bereich des Rückens sowie eine Parese der Hintergliedmaßen mit lateraler Abspreizung der Hinterfüße auf. Nach ic-Inokulation waren die Symptome der tga20-Mäuse ähnlich denen der CD-1-Mäuse. Dagegen zeigten tga20-Mäuse nach den beiden peripheren Inokulationswegen eine extrem langgestreckte Körperhaltung ohne Ausbildung einer Kyphose. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die Inokulation eines bestimmten Prionen-Stammes zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen der Krankheit innerhalb der tga20-Mauslinie führt, dass also die klinischen Symptome abhängig von der Inokulationsroute waren.

Die Untersuchung der neuropathologischen Veränderungen in den Gehirnen der Tiere zeigte, dass die tga20-Mäuse im späten Stadium der Erkrankung eine geringere Vakuolisierung und eine schwächere astrozytäre Gliose ausbilden sowie weniger PrPsc akkumulieren verglichen mit den Wildtyp-Mäusen im vergleichbaren Krankheitsstadium. Dabei war dieser Unterschied nach den beiden peripheren Inokulationsrouten deutlicher als nach intrazerebraler Inokulation. Zudem konnte bereits in präklinischen Krankheitsstadien in den Gehirnen der Tiere beider Wildtyp-Mausstämme regelmäßig eine deutliche Ausbildung TSE-spezifischer Vakuolen sowie eine Astrozytose und PrPsc-Akkumulation festgestellt werden. Dies war in den Gehirnen der tga20-Mäuse nicht der Fall. Die präklinischen Veränderungen bei den Wildtyp-Mäusen waren meist stärker ausgeprägt als bei klinisch kranken tga20-Mäusen. Demnach scheint die Ausbildung von spongiformen Läsionen sowie eine Astrozytenaktivierung und die Akkumulation von PrPsc weder notwendig noch ausreichend zu sein für die Ausbildung von klinischen Symptomen bis hin zum späten Krankheitsstadium.

In der vorliegenden Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass PrPsc präklinisch häufig vor dem Auftreten von TSE-spezifischen Vakuolen nachweisbar ist und bei den tga20-Mäusen auch im späten Krankheitsstadium nicht immer mit dem Nachweis von Vakuolen korreliert.

7 Summary

The present study characterized the relationships between the course of scrapie and the development of typical scrapie symptoms as well as between the development of TSE-specific vacuoles, astrogliosis, and the accumulation of PrP^{Sc} in the mouse model. Mice of two wild-type lines (CD-1 and C57/Bl6) and mice of the transgenic tga20 strain were inoculated intracerebrally (ic), intraperitoneally (ip), and orally with a 1% and 10% brain homogenate of the mouse-adapted Rocky Mountain Laboratory (RML) prion strain. Tga20 mice overexpress cellular prion protein in the brain by a factor of ten in comparison to wild-type mice and therefore exhibit shorter incubation times. The course of the disease and the clinical symptoms were documented, and the animals' brains were examined during the preclinical stages, after the onset of symptoms, and in the late stage of the disease. In addition to ic-inoculation, two peripheral inoculation routes were investigated for the first time in detail in tga20 mice.

Vacuolization was evaluated in HE-stained histologic sections. The development of astrogliosis was ascertained on the basis of the number of astrocytes as determined by immunohistochemical staining and on the basis of GFAP gene expression as determined by RT-PCR and northern blot analysis. PrP^{Sc} accumulation was assessed in histologic brain sections by immunohistochemical staining and western blotting.

After all three inoculation routes the tga20 mice exhibited shortened incubation times in comparison to their wild-type counterparts. Clinical evaluation of the animals revealed differences between the symptoms in the three mouse strains. The chief symptoms of the two wild-type mouse strains were progressive ataxia, emaciation, lethargy, kyphosis and dull, rough fur. The C57/Bl6 mice also showed convulsions of the skin muscles on the back at irregular intervals as well as paresis of the hind legs with lateral spreading of the hind feet. Following ic-inoculation the symptoms in the tga20 mice were similar to those in the CD-1 mice. By contrast, after the two peripheral inoculation methods, the tga20 mice exhibited an extremely elongated posture without development of kyphosis. Thus, it was shown for the first time that inoculation of a specific prion strain leads to different clinical manifestations of the disease within the tga20 mouse strain, with the clinical symptoms depending on the inoculation route.

Examination of the neuropathologic changes in the animals' brains showed that in the late stage of the disease the tga20 mice had less pronounced vacuolization, astrogliosis, and PrP^{Sc} accumulation than the wild-type mice in a comparable disease stage. This difference was

more pronounced after the two peripheral inoculation routes than after ic-inoculation. Moreover, marked development of TSE-specific vacuoles, astrogliosis, and PrP^{Sc} accumulation were observed in the brains of both wild-type strains even in the preclinical disease stages. This was not the case in the tga20 mice. The preclinical changes were generally more pronounced in the wild-type mice than in the clinically affected tga20 mice. Hence, spongiform lesion development, astrocyte activation, and PrP^{Sc} accumulation do not appear to be necessary or sufficient for the development of clinical symptoms up to the late disease stage.

The present study also showed that PrP^{Sc} is often detectable preclinically before the appearance of TSE-specific vacuoles and in the case of tga20 mice does not always correlate with the observation of vacuoles even in the late stage of the disease.

8 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A. (2004). Understanding the diversity of prions. *Nat. Cell Biol.* **6**(4), 290-292.
- Aguzzi, A., and Heikenwalder, M. (2005). Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity.* **22**(2), 145-154.
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., and Polymenidou, M. (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**(7), 552-561.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., and Heikenwalder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 11-40.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**(5090), 764-766.
- Alpers, M., and Gajdusek, D. C. (1965). Changing patterns of kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the Fore people with western civilization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **14**(5), 852-879.
- Alpers, M., and Rail, L. (1971). Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: clinical and aetiological aspects. *Proc. Aust. Assoc. Neurol.* **8**, 7-15.
- Alpers, M. P. (2008). Review. The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **363**(1510), 3707-3713.
- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., and Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* **83**(Pt 10), 2607-2616.
- Angers, R. C., Browning, S. R., Seward, T. S., Sigurdson, C. J., Miller, M. W., Hoover, E. A., and Telling, G. C. (2006). Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. *Science* **311**(5764), 1117.
- Anonym. (2008a). Bovine Spongiform Encephalopathy. *OIE Terrestrial Manual 2008* http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.06_BSE.pdf. 671-682.
- Anonym. (2008b). Chronic Wasting Disease. *Disease Factsheets (Iowa State University)* http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chronic_wasting_disease.pdf. 1-7.
- Anonym. (2008c). Scrapie. *OIE Terrestrial Manual 2008* http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.13_SCRAPIE.pdf. 1048-1057.
- Anonym. (2011a). Number of cases of BSE reported in the United Kingdom. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-cases-in-the-united-kingdom>.

Anonym. (2011b). Number of reported cases of BSE in farmed cattle worldwide (excluding the United Kingdom). <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/number-of-reported-cases-worldwide-excluding-the-united-kingdom>.

Anonym. (2011c). vCJD cases worldwide. *The National Creutzfeldt-Jakob Surveillance Unit (NCJDSU)* <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>.

Baker, H. F., Duchon, L. W., Jacobs, J. M., and Ridley, R. M. (1990). Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from Creutzfeldt-Jakob and familial Gerstmann-Sträussler-Scheinker Diseases. *Brain* **113**(Pt 6), 1891-1909.

Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills, B., and Groschup, M. H. (2011). Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev. Vet. Med.* **102**(2), 112-117.

Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Morignat, E., and Bessen, R. A. (2007a). Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. *Emerg. Infect. Dis.* **13**(12), 1887-1894.

Baron, T., Biacabe, A. G., Arsac, J. N., Benestad, S., and Groschup, M. H. (2007b). Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. *Vaccine* **25**(30), 5625-5630.

Beck, E., Daniel, P. M., Alpers, M., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J., Jr. (1966). Experimental "kuru" in chimpanzees. A pathological report. *Lancet* **2**(7472), 1056-1059.

Begara-McGorum, I., Gonzalez, L., Simmons, M., Hunter, N., Houston, F., and Jeffrey, M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: Factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol.* **127**(1), 59-68.

Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de, R. J., Gielkens, A. L., and Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* **76**(Pt 3), 509-517.

Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., and Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.* **39**(4), 19.

Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., and Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* **153**(7), 202-208.

Beringue, V., Bencsik, A., Le, D. A., Reine, F., Lai, T. L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A. G., Baron, T., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS. Pathog.* **2**(10), e112.

Beringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le, D. A., Casalone, C., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2008). Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(12), 1898-1901.

Beringue, V., Mallinson, G., Kaiser, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* **126**(Pt 9), 2065-73.

- Bessen, R. A. (1996). Neurodegenerative Prion Diseases. *Science & Medicine*. 12-19.
- Bessen, R. A., Martinka, S., Kelly, J., and Gonzalez, D. (2009). Role of the lymphoreticular system in prion neuroinvasion from the oral and nasal mucosa. *J. Virol.* **83**(13), 6435-6445.
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., and Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.* **5**(1), 110-115.
- Bolea, R., Hortells, P., Martin-Burriel, I., Vargas, A., Ryffel, B., Monzon, M., and Badiola, J. J. (2010). Consequences of dietary manganese and copper imbalance on neuronal apoptosis in a murine model of scrapie. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **36**(4), 300-311.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**(4579), 1309-1311.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**(6563), 339-343.
- Brandner, S., Whitfield, J., Boone, K., Puwa, A., O'Malley, C., Linehan, J. M., Joiner, S., Scaravilli, F., Calder, I., Alpers, P., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2008). Central and peripheral pathology of kuru: pathological analysis of a recent case and comparison with other forms of human prion disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **363**(1510), 3755-3763.
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A. D., Toyka, K. V., Nave, K. A., Weis, J., and Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* **13**(3), 310-318.
- Brotherston, J. G., Renwick, C. C., Stamp, J. T., Zlotnik, I., and Pattison, I. H. (1968). Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J. Comp Pathol.* **78**(1), 9-17.
- Brown, D. R., Nicholas, R. S., and Canevari, L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.* **67**(2), 211-224.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von, B. A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretzschmar, H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**(6661), 684-687.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* **146**(1), 104-112.
- Brown, P., Cervenakova, L., Goldfarb, L. G., McCombie, W. R., Rubenstein, R., Will, R. G., Pocchiari, M., Martinez-Lage, J. F., Scalici, C., Masullo, C., and . (1994a). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine. *Neurology* **44**(2), 291-293.
- Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., Goldfarb, L. G., and Gajdusek, D. C. (1994b). Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* **35**(5), 513-529.

- Brown, P., Goldfarb, L. G., Brown, W. T., Goldgaber, D., Rubenstein, R., Kascsak, R. J., Guirouy, D. C., Piccardo, P., Boellaard, J. W., and Gajdusek, D. C. (1991). Clinical and molecular genetic study of a large German kindred with Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Neurology* **41**(3), 375-379.
- Brown, P., Preece, M. A., and Will, R. G. (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **340**(8810), 24-27.
- Bruce, M. E. (1996). Strain typing studies of scrapie and BSE. *Methods in molecular medicine: prion diseases* (Humana Press Inc). 223-236.
- Bruce, M. E., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., and Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Phil Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* **343**, 405-411.
- Bruce, M. E., Fraser, H., McBride, P. A., Scott, J. R., and Dickinson, A. G. (1992). The basis of strain variation in scrapie. *Prion diseases in humans and animals*. 497-508.
- Bruce, M. E., McConnell, I., Will, R. G., and Ironside, J. W. (2001). Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* **358**(9277), 208-209.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**(7), 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**(6370), 577-582.
- Buschmann, A., Biacabe, A. G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J. Y., Erhardt, G., Luhken, G., Baron, T., and Groschup, M. H. (2004). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* **117**(1), 27-36.
- Buschmann, A., Gretschel, A., Biacabe, A. G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C., and Groschup, M. H. (2006). Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet. Microbiol.* **117**(2-4), 103-116.
- Cancellotti, E., Barron, R. M., Bishop, M. T., Hart, P., Wiseman, F., and Manson, J. C. (2007). The role of host PrP in Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Biochem. Biophys. Acta.* **1772**(6), 673-680.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**(9), 3065-3070.
- Castilla, J., Brun, A., az-San, S. F., Salguero, F. J., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Ramirez, M. A., del, R. L., and Torres, J. M. (2005). Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model. *J. Virol.* **79**(13), 8665-8668.
- Castilla, J., Gutierrez-Adan, A., Brun, A., Doyle, D., Pintado, B., Ramirez, M. A., Salguero, F. J., Parra, B., Segundo, F. D., Sanchez-Vizcaino, J. M., Rogers, M., and Torres, J. M.

(2004a). Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J. Neurosci.* **24**(21), 5063-5069.

Castilla, J., Gutierrez-Adan, A., Brun, A., Doyle, D., Pintado, B., Ramirez, M. A., Salguero, F. J., Parra, B., Segundo, F. D., Sanchez-Vizcaino, J. M., Rogers, M., and Torres, J. M. (2004b). Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J. Neurosci.* **24**(21), 5063-5069.

Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**(7191), 1378-1379.

Chiesa, R., and Harris, D. A. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.* **8**(5), 743-763.

Clark, W. W., Hourrigan, J. L., and Hadlow, W. J. (1995). Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent. *Am. J. Vet. Res.* **56**(5), 606-612.

Colchester, A. C., and Colchester, N. T. (2005). The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet* **366**(9488), 856-861.

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**(6602), 685-690.

Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Frosh, A., Mead, S., Hill, A. F., Brandner, S., Thomas, D., and Alpers, M. P. (2008). A clinical study of kuru patients with long incubation periods at the end of the epidemic in Papua New Guinea. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **363**(1510), 3725-3739.

Collins, S., Boyd, A., Fletcher, A., Gonzales, M., McLean, C. A., Byron, K., and Masters, C. L. (2000). Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic utility of 14-3-3 protein immunodetection in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Neurosci.* **7**(3), 203-208.

Collins, S., McLean, C. A., and Masters, C. L. (2001). Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J. Clin. Neurosci.* **8**(5), 387-397.

Cook, W. (2007). Nor98-like strain of scrapie found in Wyoming. *Wyoming Livestock Board*.

Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitung Neurol. Psychiatr.* **57**, 1-18.

Cuille, J., and Chelle, P. L. (1939). Transmission experimentale de la tremblante chez la chevre. *C R Acad Sci.* **208**, 1058-1060.

Cutlip, R. C., Miller, J. M., Hamir, A. N., Peters, J., Robinson, M. M., Jenny, A. L., Lehmkuhl, H. D., Taylor, W. D., and Bisplinghoff, F. D. (2001). Resistance of cattle to scrapie by the oral route. *Can. J. Vet. Res.* **65**(2), 131-132.

Cutlip, R. C., Miller, J. M., Race, R. E., Jenny, A. L., Katz, J. B., Lehmkuhl, H. D., DeBey, B. M., and Robinson, M. M. (1994). Intracerebral transmission of scrapie to cattle. *J. Infect. Dis.* **169**(4), 814-820.

- Dawson, M., Wells, G. A., Parker, B. N., and Scott, A. C. (1990). Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Vet. Rec.* **127**(13), 338.
- Dawson, M., Wells, G. A., Parker, B. N. J., and Scott, A. C. (1991). Transmission studies of BSE in cattle, hamsters, pigs and domestic fowl. *Sub-acute spongiform encephalopathies. Amsterdam Kluwer Academic.* 25-32.
- De Bosschere H., Roels, S., Benestad, S. L., and Vanopdenbosch, E. (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet. Rec.* **155**(22), 707-708.
- DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M. R., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* **19**(6), 1337-1348.
- DeArmond, S. J., Qiu, Y., Sanchez, H., Spilman, P. R., Ninchak-Casey, A., Alonso, D., and Daggett, V. (1999). PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**(9), 1000-1009.
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M., Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J. Comp Pathol.* **78**(3), 293-299.
- Diedrich, J. F., Bendheim, P. E., Kim, Y. S., Carp, R. I., and Haase, A. T. (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 375-379.
- Doherr, M. (2008). Transmissible Spongiforme Enzephalopathien in anderen Spezies. *NeuroCenter der Universität Bern* <http://www.neurocenter-bern.ch/tse.shtml>.
- Doi, S., Ito, M., Shinagawa, M., Sato, G., Isomura, H., and Goto, H. (1988). Western blot detection of scrapie-associated fibril protein in tissues outside the central nervous system from preclinical scrapie-infected mice. *J. Gen. Virol.* **69**(Pt 4), 955-960.
- Dong, C. F., Wang, X. F., Wang, X., Shi, S., Wang, G. R., Shan, B., An, R., Li, X. L., Zhang, B. Y., Han, J., and Dong, X. P. (2008). Molecular interaction between prion protein and GFAP both in native and recombinant forms in vitro. *Med Microbiol Immunol.* **197**(4), 361-368.
- Donofrio, G., Heppner, F.L., Polymenidou, M., Musahl, C., and Aguzzi, A. (2005). Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J. Virol.* **79**(13), 8330-8338.
- Drew, S. C., Haigh, C. L., Klemm, H. M., Masters, C. L., Collins, S. J., Barnham, K. J., and Lawson, V. A. (2011). Optical imaging detects apoptosis in the brain and peripheral organs of prion-infected mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**(2), 143-150.
- Ducrot, C., Arnold, M., de, K. A., Heim, D., and Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet. Res.* **39**(4), 15.

- Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le, D. A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F., and Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.* **156**(16), 523-524.
- Ersdal, C., Simmons, M. M., Gonzalez, L., Goodsir, C. M., Martin, S., and Jeffrey, M. (2004). Relationships between ultrastructural scrapie pathology and patterns of abnormal prion protein accumulation. *Acta Neuropathol.* **107**(5), 428-438.
- Everest, S. J., Thorne, L. T., Hawthorn, J. A., Jenkins, R., Hammersley, C., Ramsay, A. M., Hawkins, S. A., Venables, L., Flynn, L., Sayers, R., Kilpatrick, J., Sach, A., Hope, J., and Jackman, R. (2006). No abnormal prion protein detected in the milk of cattle infected with the bovine spongiform encephalopathy agent. *J. Gen. Virol.* **87**(Pt 8), 2433-2441.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15**(6), 1255-1264.
- Ford, M. J., Burton, L. J., Morris, R. J., and Hall, S. M. (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113**(1), 177-192.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**(6420), 543-546.
- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., Billette, d., V, and Robain, O. (1995). Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C. R. Acad. Sci. III* **318**(3), 339-344.
- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., Billette, d., V, Robain, O., Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Dormont, D., and Brown, P. (1998). Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res.* **292**(1), 77-84.
- Fox, K. A., Jewell, J. E., Williams, E. S., and Miller, M. W. (2006). Patterns of PrP^{CWD} accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J. Gen. Virol.* **87**(Pt 11), 3451-3461.
- Fraser, E., McDonagh, A. M., Head, M., Bishop, M., Ironside, J. W., and Mann, D. M. (2003). Neuronal and astrocytic responses involving the serotonergic system in human spongiform encephalopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**(5), 482-495.
- Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J. Comp Pathol.* **78**(3), 301-311.
- Fraser, H., McConnell, I., Wells, G. A., and Dawson, M. (1988). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet. Rec.* **123**(18), 472.
- Fraser, H., Pearson, G. R., McConnell, I., Bruce, M. E., Wyatt, J. M., and Gruffydd-Jones, T. J. (1994). Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet. Rec.* **134**(17), 449.

- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., and Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**(5025), 794-796.
- Gajdusek, D. C., and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* **257**(20), 974-978.
- Gauczynski, S., Nikles, D., El-Gogo, S., Papy-Garcia, D., Rey, C., Alban, S., Barritault, D., Lasmezas, C. I., and Weiss, S. (2006). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes. *J. Infect. Dis.* **194**(5), 702-709.
- Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I., and Weiss, S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* **20**(21), 5863-5875.
- Geissen, M., Leidel, F., Eiden, M., Hirschberger, T., Fast, C., Bertsch, U., Tavan, P., Giese, A., Kretzschmar, H., Schatzl, H. M., and Groschup, M. H. (2011). From High-Throughput Cell Culture Screening to Mouse Model: Identification of New Inhibitor Classes against Prion Disease. *Chem Med Chem.* **6**(10), 1928-1937.
- Gerstmann, J. (1928). Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems. *W Med Wschr.* **78**, 906-908.
- Gerstmann, J., Sträussler, E., and Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **154**, 736-762.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., and Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**(839), 388-389.
- Giese, A., Brown, D. R., Groschup, M. H., Feldmann, C., Haist, I., and Kretzschmar, H. A. (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* **8**(3), 449-457.
- Giese, A., Groschup, M. H., Hess, B., and Kretzschmar, H. A. (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* **5**(3), 213-221.
- Giese, A., and Kretzschmar, H. A. (2001). Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**, 203-217.
- Glatzel, M., Abela, E., Maissen, M., and Aguzzi, A. (2003). Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* **349**(19), 1812-1820.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., and Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol.* **75**(Pt 5), 989-995.

- Gomes, F. C., Paulin, D., and Moura, N., V (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**(5), 619-631.
- Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., and Itohara, S. (1995). Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* **14**(1), 29-41.
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* **215**(5105), 1043-1044.
- Groschup, M. H., and Buschmann, A. (2008). Rodent models for prion diseases. *Vet. Res.* **39**(4), 32.
- Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Luhken, G., Mathey, J., Eiden, M., Lugan, S., Hoffmann, C., Espinosa, J. C., Baron, T., Torres, J. M., Erhardt, G., and Andreoletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg. Infect. Dis.* **13**(8), 1201-1207.
- Hadlow, W. J. (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* **2**, 289-290.
- Hadlow, W. J. (1999). Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Pathol.* **36**(6), 523-529.
- Hadlow, W. J., Kennedy, R. C., and Race, R. E. (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.* **146**(5), 657-664.
- Haeberle, A. M., Ribaut-Barassin, C., Bombarde, G., Mariani, J., Hunsmann, G., Grassi, J., and Bailly, Y. (2000). Synaptic prion protein immuno-reactivity in the rodent cerebellum. *Microsc. Res. Tech.* **50**(1), 66-75.
- Haik, S., Faucheux, B. A., Sazdovitch, V., Privat, N., Kemeny, J. L., Perret-Liaudet, A., and Hauw, J. J. (2003). The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat. Med.* **9**(9), 1121-1123.
- Hainfellner, J. A., Liberski, P. P., Guiroy, D. C., Cervenakova, L., Brown, P., Gajdusek, D. C., and Budka, H. (1997). Pathology and immunocytochemistry of a kuru brain. *Brain Pathol.* **7**(1), 547-553.
- Hamir, A. N., Clark, W. W., Sutton, D. L., Miller, J. M., Stack, M. J., Chaplin, M. J., and Jenny, A. L. (2002). Resistance of domestic cats to a US sheep scrapie agent by intracerebral route. *J. Vet. Diagn. Invest* **14**(5), 444-445.
- Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Miller, J. M., Bartz, J. C., and Richt, J. A. (2006). First and second cattle passage of transmissible mink encephalopathy by intracerebral inoculation. *Vet. Pathol.* **43**(2), 118-126.
- Hanson, R. P., Eckroade, R. J., Marsh, R. F., Zu Rhein, G. M., Kanitz, C. L., and Gustafson, D. P. (1971). Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science* **172**(985), 859-861.

- Harrington, M. G., Merril, C. R., Asher, D. M., and Gajdusek, D. C. (1986). Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* **315**(5), 279-283.
- Hartsough, G. R., and Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis.* **115**(4), 387-392.
- Hayakawa, N., Kato, H., and Araki, T. (2007). Age-related changes of astrocytes, oligodendrocytes and microglia in the mouse hippocampal CA1 sector. *Mech. Ageing Dev.* **128**(4), 311-316.
- Haybaeck, J., Heikenwalder, M., Klevenz, B., Schwarz, P., Margalith, I., Bridel, C., Mertz, K., Zirdum, E., Petsch, B., Fuchs, T. J., Stitz, L., and Aguzzi, A. (2011). Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS. Pathog.* **7**(1), e1001257.
- Head, M. W., and Ironside, J. W. (2005). Mad cows and monkey business: the end of vCJD? *Lancet* **365**(9461), 730-731.
- Healy, A. M., Weavers, E., McElroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J. D., O'Doherty, E., Sweeney, T., and Doherty, M. L. (2003). The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J. Vet. Intern. Med.* **17**(6), 908-916.
- Heikenwalder, M., Zeller, N., Seeger, H., Prinz, M., Klohn, P. C., Schwarz, P., Ruddle, N. H., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (2005). Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* **307**(5712), 1107-1110.
- Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B., Varges, D., Kallenberg, K., Schulz-Schaeffer, W. J., Steinhoff, B. J., Grasbon-Frodl, E. M., Kretzschmar, H. A., and Zerr, I. (2007). Creutzfeldt-Jakob disease in Germany: a prospective 12-year surveillance. *Brain* **130**(Pt 5), 1350-1359.
- Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P., and Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat. Med.* **7**(9), 976-977.
- Herzog, C., Sales, N., Etchegaray, N., Charbonnier, A., Freire, S., Dormont, D., Deslys, J. P., and Lasmezas, C. I. (2004). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* **363**(9407), 422-428.
- Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L., and Collinge, J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* **353**(9148), 183-189.
- Hill, A. F., and Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection. *Trends Microbiol.* **11**(12), 578-584.
- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(18), 10248-10253.

Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B., and Groschup, M. H. (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **88**(Pt 3), 1048-1055.

Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.* **15**(3), 827-852.

Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., and Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* **112**(12), 4739-4745.

Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C. J., Lee, K. H., and Harrington, M. G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J. Med.* **335**(13), 924-930.

Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., and Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* **83**(Pt 11), 2897-2905.

Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J., and Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* **141**(5), 809-824.

Jakob, A. (1921). Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische pseudosklerotische Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Zeitschr. Nervenheilkd.* **70**, 132-146.

Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Bruce, M. E., McBride, P. A., Scott, J. R., and Halliday, W. G. (1992). Infection specific prion protein (PrP) accumulates on neuronal plasmalemma in scrapie infected mice. *Neurosci Lett.* **147**(1), 106-109.

Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Grassi, J., and Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J. Comp Pathol.* **134**(2-3), 171-181.

Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C. M., and Gonzalez, L. (2009). Strain-associated variations in abnormal PrP-trafficking of sheep scrapie. *Brain Pathol.* **19**(1), 1-11.

Jeffrey, M., McGovern, G., Siso, S., and Gonzalez, L. (2011). Cellular and sub-cellular pathology of animal prion diseases: relationship between morphological changes, accumulation of abnormal prion protein and clinical disease. *Acta Neuropathol.* **121**(1), 113-134.

Jewell, J. E., Brown, J., Kreeger, T., and Williams, E. S. (2006). Prion protein in cardiac muscle of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) infected with chronic wasting disease. *J. Gen. Virol.* **87**(Pt 11), 3443-3450.

- Kaeser, P.S., Klein, M.A., Schwarz, P., Aguzzi, A. (2001). Efficient lymphoreticular prion propagation requires PrP(c) in stromal and hematopoietic cells. *J. Virol.* **75**(15), 7097-7106.
- Kamphues, J. (1997). Alternatives to presently established forms of animal body removal--tolerated, intended and feared?. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **104**(7), 257-260.
- Karapetyan, Y. E., Saa, P., Mahal, S. P., Sferrazza, G. F., Sherman, A.; Sales, N., Weissmann, C., and Lasmezas, C. I. (2009). Prion strain discrimination based on rapid in vivo amplification and analysis by the cell panel assay. *PloS. One.* **4**(5), e5730.
- Kellings, K., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (1994). Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **343**(1306), 425-430.
- Kimberlin, R. H., Hall, S. M., and Walker, C. A. (1983). Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci.* **61**(3), 315-25.
- Kimberlin, R. H., and Walker, C. A. (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally and intraocularly. *J Gen Virol.* **67**(Pt 2), 255-63.
- Kimberlin, R. H., and Walker, C. A. (1988). Pathogenesis of experimental scrapie. *Ciba Found. Symp.* **135**, 37-62.
- Kimberlin, R. H., Walker, C. A., and Fraser, H. (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J. Gen. Virol.* **70**(Pt 8), 2017-2025.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K., and Tateishi, J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* **65**(11), 6292-6295.
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C., and Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* **8**(4), 799-847.
- Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M., and Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**(6661), 687-690.
- Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., cha-Orbea, H., and Aguzzi, A. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* **7**(4), 488-492.
- Knight. (2009). Potential treatments for Creutzfeldt-Jakob disease. *The National Creutzfeldt-Jakob Surveillance Unit (NCJDSU)* <http://www.cjd.ed.ac.uk/TREAT.htm>.
- Kong, Q., Huang, S., Zou, W., Vanegas, D., Wang, M., Wu, D., Yuan, J., Zheng, M., Bai, H., Deng, H., Chen, K., Jenny, A. L., O'Rourke, K., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Petersen, R. B., Sy, M. S., Chen, S. G., and Gambetti, P. (2005). Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J. Neurosci.* **25**(35), 7944-7949.

- Konold, T., Davis, A., Bone, G., Bracegirdle, J., Everitt, S., Chaplin, M., Saunders, G. C., Cawthraw, S., and Simmons, M. M. (2007). Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC. Vet. Res.* **3**, 2.
- Konold, T., Davis, A., Bone, G. E., Simmons, M. M., Kahn, J., Blake-Dyke, M. C., Bracegirdle, J., and Shimwell, C. J. (2006). Atypical scrapie cases in the UK. *Vet. Rec.* **158**(8), 280.
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., and Simmons, H. A. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC. Vet. Res.* **4**, 14.
- Kovacs, G. G., and Budka, H. (2009). Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci.* **10**(3), 976-999.
- Kuczius, T., and Groschup, M. H. (1999). Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol. Med.* **5**(6), 406-418.
- Kuczius, T., Haist, I., and Groschup, M. H. (1998). Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J. Infect. Dis.* **178**(3), 693-699.
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbiere, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., and Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS. Pathog.* **4**(12), e1000238.
- Langevin, C., Andreoletti, O., Le Dur A., Laude, H., and Beringue, V. (2011). Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* **41**(1), 219-225.
- Lasmezas, C. I. (2003). The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. Tech.* **22**(1), 23-36.
- Lasmezas, C. I., Comoy, E., Hawkins, S., Herzog, C., Mouthon, F., Konold, T., Auvre, F., Correia, E., Lescoutra-Etchegaray, N., Sales, N., Wells, G., Brown, P., and Deslys, J. P. (2005). Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* **365**(9461), 781-783.
- Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**(6585), 743-744.
- Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**(5298), 402-405.
- Latarjet, R., Muel, B., Haig, D. A., Clarke, M. C., and Alper, T. (1970). Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* **227**(5265), 1341-1343.
- Lazarini, F., Boussin, F., Deslys, J. P., Tardy, M., and Dormont, D. (1994). Astrocyte gene expression in experimental mouse scrapie. *J. Comp Pathol.* **111**(1), 87-98.

Leblanc, P., Alais, S., Porto-Carreiro, I., Lehmann, S., Grassi, J., Raposo, G., and Darlix, J. L. (2006). Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J.* **25**(12), 2674-2685.

Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., and Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**(44), 16031-16036.

Leidel, F., Eiden, M., Geissen, M., Kretzschmar, H. A., Giese, A., Hirschberger, T., Tavan, P., Schatzl, H. M., and Groschup, M. H. (2011). Diphenylpyrazole-derived compounds increase survival time of mice after prion infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(10), 4774-4781.

Levavasseur, E., Laffont-Proust, I., Morain, E., Faucheux, B. A., Privat, N., Peoc'h, K., Sazdovitch, V., Brandel, J. P., Hauw, J. J., and Haik, S. (2008). Regulating factors of PrP glycosylation in Creutzfeldt-Jakob disease--implications for the dissemination and the diagnosis of human prion strains. *PLoS One.* **3**(7), e2786.

Ligos, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., Maestrale, C., Cancedda, M. G., Madau, L., and Aguzzi, A. (2005). PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat. Med.* **11**(11), 1137-1138.

Lindenbaum, S. (1979). Kuru sorcery: disease and danger in the New Guinea Highlands. *Palo Alto, CA: Mayfield.*

Llewelyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., and Will, R. G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**(9407), 417-421.

Lugaresi, E., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P. L., and Medori, R. (1986). Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev. Neurol.* **142**(10), 791-792.

Mabbott, N. A., and Bruce, M. E. (2003). Prion disease: bridging the spleen-nerve gap. *Nat. Med.* **9**(12), 1463-1464.

Mabbott, N. A., Bruce, M. E., Botto, M., Walport, M. J., and Pepys, M. B. (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat. Med.* **7**(4), 485-487.

Mabbott, N. A., Mackay, F., Minns, F., and Bruce, M. E. (2000). Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat. Med.* **6**(7), 719-720.

Mallucci, G., and Collinge, J. (2005). Rational targeting for prion proteins. *Nat Rev Neurosci.* **6**(1), 23-34.

Manuelidis, L. (2004). A virus behind the mask of prions? *Folia Neuropathol.* **42** Suppl B, 10-23.

- Manuelidis, L., Tesin, D. M., Sklaviadis, T., and Manuelidis, E. E. (1987). Astrocyte gene expression in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**(16), 5937-5941.
- Manuelidis, L., Yu, Z. X., Barquero, N., and Mullins, B. (2007). Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(6), 1965-1970.
- Marsh, R. F., and Bessen, R. A. (1993). Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Dev. Biol. Stand.* **80**, 111-118.
- Marsh, R. F., Bessen, R. A., Lehmann, S., and Hartsough, G. R. (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **72**(Pt 3), 589-594.
- Marsh, R. F., Burger, D., Eckroade, R., Zu Rhein, G. M., and Hanson, R. P. (1969). A preliminary report on the experimental host range of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Infect. Dis.* **120**(6), 713-719.
- Marsh, R. F., and Hadlow, W. J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev. Sci. Tech.* **11**(2), 539-550.
- Marsh, R. F., Sipe, J. C., Morse, S. S., and Hanson, R. P. (1976). Transmissible mink encephalopathy: reduced spongiform degeneration in aged mink of the Chediak-Higashi genotype. *Lab Invest.* **34**(4), 381-386.
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J., Jr. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* **104**(3), 559-588.
- Mastrianni, J. A., Nixon, R., Layzer, R., Telling, G. C., Han, D., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1999). Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N. Engl. J. Med.* **340**(21), 1630-1638.
- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C., and Hoover, E. A. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**(5796), 133-136.
- McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Gonatas, N. (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest.* **65**(6), 622-630.
- McLean, C. A., Ironside, J. W., Alpers, M. P., Brown, P. W., Cervenakova, L., Anderson, R. M., and Masters, C. L. (1998). Comparative neuropathology of Kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host. *Brain Pathol.* **8**(3), 429-437.
- McLean, I. W., and Nakane, P. K. (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem Cytochem.* **22**(12), 1077-83.

- Medori, R., Tritschler, H. J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P., and . (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med.* **326**(7), 444-449.
- Merz, P. A., Rohwer, R. G., Kascsak, R., Wisniewski, H. M., Somerville, R. A., Gibbs, C. J., Jr., and Gajdusek, D. C. (1984). Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* **225**(4660), 437-440.
- Mields, W., Diring, H., and Baier, M. (2001). Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) des Rindes und deren Übertragbarkeit auf den Menschen. <http://www.bfr.bund.de/cd/675>.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**(5469), 1257-1259.
- Mouton, P. R., Long, J. M., Lei, D. L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M. E., and Ingram, D. K. (2002). Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res.* **956**(1), 30-35.
- Mulcahy, E. R., Bartz, J. C., Kincaid, A. E., Bessen, R. A. (2004). Prion infection of skeletal muscle cells and papillae in the tongue. *J. Virol.* **78**(13), 6792-6798.
- Nathanson, N., Wilesmith, J., and Griot, C. (1997). Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am. J. Epidemiol.* **145**(11), 959-969.
- Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drogemüller, C., Zurbriggen, A., and Seuberlich, T. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS. Pathog.* **3**(6), e82.
- Oesch, B., Teplow, D. B., Stahl, N., Serban, D., Hood, L. E., and Prusiner, S. B. (1990). Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* **29**(24), 5848-5855.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., and Hood, L. E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP²⁷⁻³⁰ protein. *Cell* **40**(4), 735-746.
- Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., Benestad, S. L., and Bassett, H. F. (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet. Rec.* **155**(20), 636-637.
- Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Terao, K., and Sata, T. (2011). Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**(1), 81-84.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**(23), 10962-10966.

- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., and Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* **39**(6), 767-778.
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N., and Watson, W. A. (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br. Vet. J.* **130**(4), lxxv-lxxvii.
- Pattison, I. H., and Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp Pathol.* **71**, 101-109.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., and Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**(9433), 527-529.
- Peden, A. H., Ritchie, D. L., Head, M. W., and Ironside, J. W. (2006). Detection and localization of PrPSc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* **168**(3), 927-935.
- Perrier, V., Wallace, A. C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2000). Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(11), 6073-6078.
- Peyrin, J. M., Lasmezas, C. L., Haik, S., Tagliavini, F., Salmona, M., Williams, A., Richie, D., Deslys, J. P., and Dormont, D. (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport*. **10**(4), 723-729.
- Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R. M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(11), 4712-4717.
- Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A. J., Heppner, F. L., Glatzel, M., Eugster, H. P., Wagner, N., and Aguzzi, A. (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol.* **162**(4), 1103-11.
- Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M. A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K., and Aguzzi, A. (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(2), 919-924.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (1989). Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 345-374.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(23), 13363-13383.
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P., and McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**(26), 6942-6950.

- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B., and Hood, L. E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**(1), 127-134.
- Race, R., Jenny, A., and Sutton, D. (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J. Infect. Dis.* **178**(4), 949-953.
- Race, R., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B., and Chesebro, B. (2001). Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.* **75**(21), 10106-10112.
- Raymond, G. J., Raymond, L. D., Meade-White, K. D., Hughson, A. G., Favara, C., Gardner, D., Williams, E. S., Miller, M. W., Race, R. E., and Caughey, B. (2007). Transmission and adaptation of chronic wasting disease to hamsters and transgenic mice: evidence for strains. *J. Virol.* **81**(8), 4305-4314.
- Rezaie, P., and Lantos, P. L. (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**(1), 55-72.
- Richt, J. A., and Hall, S. M. (2008). BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS. Pathog.* **4**(9), e1000156.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**(6587), 180-182.
- Robinson, M. M., Hadlow, W. J., Huff, T. P., Wells, G. A., Dawson, M., Marsh, R. F., and Gorham, J. R. (1994). Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **75**(Pt 9), 2151-2155.
- Robinson, M. M., Hadlow, W. J., Knowles, D. P., Huff, T. P., Lacy, P. A., Marsh, R. F., and Gorham, J. R. (1995). Experimental infection of cattle with the agents of transmissible mink encephalopathy and scrapie. *J. Comp Pathol.* **113**(3), 241-251.
- Rohwer, R. G. (1984). Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature* **308**(5960), 658-662.
- Rutishauser, D., Mertz, K. D., Moos, R., Brunner, E., Rulicke, T., Calella, A. M., and Aguzzi, A. (2009). The comprehensive native interactome of a fully functional tagged prion protein. *PLoS. One.* **4**(2), e4446.
- Ryder, S., Dexter, G., Bellworthy, S., and Tongue, S. (2004). Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res. Vet. Sci.* **76**(3), 211-217.
- Ryder, S. J., Hawkins, S. A., Dawson, M., and Wells, G. A. (2000). The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J. Comp Pathol.* **122**(2-3), 131-143.

- Ryder, S. J., Wells, G. A., Bradshaw, J. M., and Pearson, G. R. (2001). Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* **148**(14), 437-441.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* **4**(10), 1157-1165.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**(7), 967-968.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(26), 15137-15142.
- Seeger, H., Heikenwalder, M., Zeller, N., Kranich, J., Schwarz, P., Gaspert, A., Seifert, B., Miele, G., and Aguzzi, A. (2005). Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310**(5746), 324-326.
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleon, E., Badiola, J. J., Zaragoza, P. and Martin-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet.Res.* **40**(5), 42.
- Seuberlich, T., Botteron, C., Benestad, S. L., Brunisholz, H., Wyss, R., Kihm, U., Schwermer, H., Friess, M., Nicolier, A., Heim, D., and Zurbriggen, A. (2007). Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**(1), 2-8.
- Sigurdson, C. J. (2008). A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet. Res.* **39**(4), 41.
- Sigurdson, C. J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E. A., Hornemann, S., Polymenidou, M., Miller, M. W., Glatzel, M., and Aguzzi, A. (2006). Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J. Virol.* **80**(24), 12303-12311.
- Sigurdson, C. J., and Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br. Med. Bull.* **66**, 199-212.
- Sigurdson, C. J., Williams, E. S., Miller, M. W., Spraker, T. R., O'Rourke, K. I., and Hoover, E. A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 10), 2757-2764.
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Sobow, T., Budka, H., and Ironside, J. W. (2009). Ultrastructural study of florid plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a comparison with amyloid plaques in kuru, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**(1), 46-59.
- Simmons, M. M., Konold, T., Simmons, H. A., Spencer, Y. I., Lockey, R., Spiropoulos, J., Everitt, S., and Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC. Vet. Res.* **3**, 20.

- Singh, A., Mohan, M. L., Isaac, A. O., Luo, X., Petrak, J., Vyoral, D., and Singh, N. (2009). Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. *PLoS. One.* **4**(2), e4468.
- Skinner, P.J., Abbassi, H., Chesebro, B., Race, R. E., Reilly, C., and Haase, A. T. (2006). Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie. *BMC.Genomics* **7**, 114.
- Somerville, R. A. (1999). Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 7), 1865-1872.
- Stack, M. J., Focosi-Snyman, R., Cawthraw, S., Davis, L., Chaplin, M. J., and Burke, P. J. (2009). Third atypical BSE case in Great Britain with an H-type molecular profile. *Vet. Rec.* **165**(20), 605-606.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**(2), 229-240.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* **37**(20), 7185-7193.
- Sullivan, N. D. (1985). Pathology of Domestic Animals. *Academic Press* **3**(1), 227.
- Takakura, I., Miyazawa, K., Kanaya, T., Itani, W., Watanabe, K., Ohwada, S., Watanabe, H., Hondo, T., Rose, M. T., Mori, T., Sakaguchi, S., Nishida, N., Katamine, S., Yamaguchi, T., and Aso, H. (2011). Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am. J. Pathol.* **179**(3), 1301-1309.
- Tamguney, G., Giles, K., Bouzamondo-Bernstein, E., Bosque, P. J., Miller, M. W., Safar, J., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2006). Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J. Virol.* **80**(18), 9104-9114.
- Tateishi, J., Brown, P., Kitamoto, T., Hoque, Z. M., Roos, R., Wollman, R., Cervenakova, L., and Gajdusek, D. C. (1995). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* **376**(6539), 434-435.
- Tatzelt, J., Maeda, N., Pekny, M., Yang, S. L., Betsholtz, C., Eliasson, C., Cayetano, J., Camerino, A. P., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1996). Scrapie in mice deficient in apolipoprotein E or glial fibrillary acidic protein. *Neurology* **47**(2), 449-453.
- Taylor, D.M., Brown, J.M., Fernie, K., and McConnell, I. (1997). The effect of formic acid on BSE and scrapie infectivity in fixed and unfixed tissue. *Vet Microbiol.* **58**(2-4), 167-74.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**(5295), 2079-2082.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric

PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**(1), 79-90.

Thackray, A. M., Klein, M. A., Aguzzi, A., and Bujdoso, R. (2002). Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* **76**(5), 2510-2517.

Thackray, A. M., Klein, M. A., and Bujdoso, R. (2003). Subclinical prion disease induced by oral inoculation. *J. Virol.* **77**(14), 7991-7998.

Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**(6575), 639-642.

Tranulis, M. A., Osland, A., Bratberg, B., and Ulvund, M. J. (1999). Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 4), 1073-1077.

Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., and Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS. Biol.* **6**(4), e100.

Van Everbroeck B., Boons, J., De, L. E., Lubke, U., and Cras, P. (2004). Molecular diagnostic tools in Creutzfeldt-Jakob disease and other prion disorders. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **4**(3), 351-359.

Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J., and Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**(9277), 171-180.

Wadsworth, J. D., Joiner, S., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Fox, K., Cooper, S., Cronier, S., Asante, E. A., Mead, S., Brandner, S., Hill, A. F., and Collinge, J. (2008). Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(10), 3885-3890.

Weinstein, D. E., Shelanski, M. L., and Liem, R. K. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* **112**(6), 1205-1213.

Weissmann, C., Enari, M., Klöhn, P. C., Rossi, D., and Flechsig, E. (2002). Molecular biology of prions. *Acta Neurobiol. Exp.* **62**(3), 153-166.

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Austin, A. R., Ryder, S. J., Done, S. H., Green, R. B., Dexter, I., Dawson, M., and Kimberlin, R. H. (2003a). Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J. Gen. Virol.* **84**(Pt 4), 1021-1031.

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Austin, A. R., Ryder, S. J., Done, S. H., Green, R. B., Dexter, I., Dawson, M., and Kimberlin, R. H. (2003b). Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J. Gen. Virol.* **84**(Pt 4), 1021-1031.

- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**(18), 419-420.
- Westaway, D., DeArmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Carlson, G. A., Prusiner, S. B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**(1), 117-129.
- Westergard, L., Christensen, H. M., and Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**(6), 629-644.
- Wietgreffe, S., Zupancic, M., Haase, A., Chesebro, B., Race, R., Frey, W., Rustan, T., and Friedman, R. L. (1985). Cloning of a gene whose expression is increased in scrapie and in senile plaques in human brain. *Science* **230**(4730), 1177-1179.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., and Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* **128**(9), 199-203.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., and Hueston, W. D. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.* **52**(3), 325-331.
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., and Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* **123**(25), 638-644.
- Will, R. G. (2002). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **72**(3), 285-286.
- Will, R. G. (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br. Med. Bull.* **66**, 255-265.
- Will, R. G., and Zeidler, M. (1996). Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ.* **313**(5), 833-4.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**(9006), 921-925.
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., and Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp. Neurol.* **144**(2), 433-438.
- Williams, E. S., and Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* **16**(1), 89-98.
- Windl, O., Buchholz, M., Neubauer, A., Schulz-Schaeffer, W., Groschup, M., Walter, S., Arendt, S., Neumann, M., Voss, A. K., and Kretzschmar, H. A. (2005). Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **79**(23), 14971-14975.

- Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R. B., Smith, M. A., Gambetti, P., Perry, G., Manson, J. C., Brown, D. R., and Sy, M. S. (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J. Neurochem.* **76**(2), 565-572.
- Wrathall, A. E. (1997). Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos. *Rev. Sci. Tech.* **16**(1), 240-264.
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Hewitt, P., and Collinge, J. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**(9552), 2061-2067.
- Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T., and Gruffydd-Jones, T. J. (1990). Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* **126**, 513.
- Yamakawa, Y., Hagiwara, K., Nohtomi, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., Higuchi, Y., Sato, Y., and Sata, T. (2003). Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**(5-6), 221-222.
- Yankner, B. A., Lu, T., and Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annu Rev Pathol.* **3**, 41-66.
- Ye, X., Scallet, A. C., Kascsak, R. J., and Carp, R. I. (1998a). Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res.* **809**(2), 277-287.
- Ye, X., Scallet, A. C., Kascsak, R. J., and Carp, R. I. (1998b). Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res.* **809**(2), 277-287.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von, S. C., Lopez, G. F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., and Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(1), 145-150.
- Zanusso, G., Righetti, P. G., Ferrari, S., Terrin, L., Farinazzo, A., Cardone, F., Pocchiari, M., Rizzuto, N., and Monaco, S. (2002). Two-dimensional mapping of three phenotype-associated isoforms of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis* **23**(2), 347-355.
- Zerr, I., Bodemer, M., Otto, M., Poser, S., Windl, O., Kretzschmar, H. A., Gefeller, O., and Weber, T. (1996). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet* **348**(9031), 846-849.
- Zhang, J., Chen, L., Zhang, B.Y., Han, J., Xiao, X.L., Tian, H.Y., Li, B.L., Gao, C., Gao, J. M., Zhou, X.B., Ma, G.P., Liu, Y., Xu, C.M., and Dong, X.P. (2004). Comparison study on clinical and neuropathological characteristics of hamsters inoculated with scrapie strain 263K in different challenging pathways. *Biomed. Environ. Sci.* **17**(1), 65-78.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5901-9

